52302
E. 51477

DISTR. : LIMITED
DISTR. : LIMITEE

WORLD HEALTH ORGANIZATION
ORGANISATION MONDIALE DE LA SANTE

WHO/PHARM/94.566

ORIGINAL : ANGLAIS

Centre collaborateur OMS pour les substances chimiques de référence

Rapport d'activité pour 1993

par M. Westermark

Les substances chimiques internationales de référence nouvellement établies, proposées par le Centre collaborateur OMS pour les substances chimiques de référence sur la base d'essais et d'une caractérisation appropriés, figurent dans le rapport annuel du Centre. Ce rapport est communiqué, entre autres, aux membres du Tableau consultatif d'experts de la Pharmacopée internationale et des Préparations pharmaceutiques, auxquels il est demandé d'examiner soigneusement les propositions ainsi que la documentation jointe concernant les analyses effectuées, et de faire part au Centre de toute réserve ou critique dans les trois mois suivant la réception du document. En de tels cas, le Centre procédera à toutes consultations ou analyses complémentaires nécessaires pour la validation de la substance.

Si aucun commentaire négatif n'est reçu dans les trois mois, les nouvelles substances chimiques internationales de référence proposées peuvent être considérées comme *provisoirement* adoptées. Leur adoption *définitive* fera l'objet d'un examen au cours de la réunion suivante du Comité d'experts.

Prière d'adresser vos remarques à Mme M. Westermark, Centre collaborateur OMS pour les substances chimiques de référence, Apoteksbolaget AB., Centrallaboratoriet, Prismavägen 2, S-10514 Stockholm, Suède.

This document is not issued to the general public, and all rights are reserved by the World Health Organization (WHO). The document may not be reviewed, abstracted, quoted, reproduced or translated, in part or in whole, without the prior written permission of WHO. No part of this document may be stored in a retrieval system or transmitted in any form or by any means - electronic, mechanical or other - without the prior written permission of WHO.

The views expressed in documents by named authors are solely the responsibility of those authors.

Ce document n'est pas destiné à être distribué au grand public et tous les droits y afférents sont réservés par l'Organisation mondiale de la Santé (OMS). Il ne peut être commenté, résumé, cité, reproduit ou traduit, partiellement ou en totalité, sans une autorisation préalable écrite de l'OMS. Aucune partie ne doit être chargée dans un système de recherche documentaire ou diffusée sous quelque forme ou par quelque moyen que ce soit - électronique, mécanique, ou autre - sans une autorisation préalable écrite de l'OMS.

Les opinions exprimées dans les documents par des auteurs cités nommément n'engagent que lesdits auteurs.

TABLE DES MATIERES

		Pages
Distribution de substances de référence en 1993		3
Distribution de spectres de référence en 1993		3
Etablissement de substances de référence en 1993		3
Travaux effectués en 1993 sur de nouvelles substances de référence		3
Essais de stabilité		3
Travaux en cours et travaux futurs		4
Questions administratives et financières		4
Remerciements		4
Appendice 1.	Distribution de substances chimiques de référence en 1993	5
Appendice 2.	Distribution de substances chimiques internationales de référence dans les différentes Régions de l'OMS en 1993	7
Appendice 3.	Distribution de spectres infrarouges internationaux de référence dans les différentes Régions de l'OMS en 1993	8
Appendice 4.	Substances chimiques internationales de référence établies en 1993	9
Appendice 5.	Liste des substances chimiques internationales de référence disponibles	10
Appendice 6.	Essais de stabilité - rapport d'analyse	15
Appendice 7.	Etude de stabilité de la nystatine à l'état sec	23
Appendice 8.	Substances chimiques internationales de référence - Liste prévisionnelle pour 1994	35
Appendice 9.	Chlorhydrate de 4-épitétracycline, N° de contrôle 293098	36
Appendice 10.	(-)-3-(4-hydroxy-3-méthoxyphényl)-2-hydrazino-2-méthylalanine (3-O-méthylcarbidopa), N° de contrôle 193180	40
Appendice 11.	Liothyronine sodique, N° de contrôle 193179	44
Appendice 12.	Chlorhydrate de néamine, N° de contrôle 193177	49
Appendice 13.	Sulfate de néomycine B, N° de contrôle 193178	53
Appendice 14.	Chlorhydrate de spectinomycine, N° de contrôle 193176	60
Appendice 15.	Sulfate de vincristine, N° de contrôle 193181	65

Note : Pour des raisons techniques, les appendices 9 à 15 n'ont été établis qu'en anglais.

Distribution de substances de référence en 1993

En 1993, le Centre a distribué 920 substances chimiques internationales de référence. Ce chiffre représente une baisse d'environ 18 % par rapport à celui de 1992. Les substances les plus fréquemment demandées ont été, dans l'ordre, le chlorhydrate de tétracycline, la rifampicine quinone, la 3-formylrifamycine, l'érythromycine, les substances de référence pour le point de fusion et le chlorhydrate d'oxytétracycline. On trouvera à l'appendice 1 le détail de la distribution des diverses substances.

En 1993, les substances ont été distribuées dans 34 pays. On trouvera à l'appendice 2 le détail de la distribution par pays. En ce qui concerne la distribution par Région de l'OMS, on constate qu'aucune substance n'a été fournie à la Région africaine; 8,5 % ont été fournies à la Région des Amériques, 32 % à la Région de la Méditerranée orientale, 53,5 % à la Région européenne, 3 % à la Région de l'Asie du Sud-Est, et 3 % à la Région du Pacifique occidental.

On peut remarquer que cette distribution varie très largement d'une année à l'autre. Par exemple, en 1992, 22 % des substances avaient été fournies à la Région africaine et seulement 5 % à la Région de la Méditerranée orientale.

Distribution de spectres de référence en 1993

En 1993, des spectres infrarouges internationaux de référence ont été disponibles pour la première fois. On trouvera à l'appendice 3 le détail de la distribution des spectres aux différentes Régions de l'OMS. Au total, 765 spectres ont été distribués, dont 40 % à la Région africaine, 8,6 % à la Région des Amériques, 18 % à la Région de la Méditerranée orientale, 15,8 % à la Région européenne, 6,6 % à la Région de l'Asie du Sud-Est, et 11 % à la Région du Pacifique occidental. Les demandes de spectres ont été très nombreuses au début, car il s'agissait d'une nouveauté, mais vers la fin 1993 elles ont été plus rares.

Etablissement de substances de référence en 1993

Conformément à la procédure recommandée par le Comité OMS d'experts des Spécifications relatives aux Préparations pharmaceutiques dans son trente-deuxième rapport (Série de Rapports techniques, N° 823), huit substances chimiques internationales de référence ont été établies en 1993. On trouvera la liste de ces substances à l'appendice 4.

On trouvera à l'appendice 5 une liste complète de toutes les substances chimiques internationales de référence détenues par le Centre en janvier 1994, avec indication de la quantité de substance contenue dans chaque unité de conditionnement et du numéro de contrôle des lots actuels. Cette liste comprend également sept substances mentionnées ci-dessous, dont on peut prévoir qu'elles seront officiellement adoptées par le Comité d'experts en 1994.

Travaux effectués en 1993 sur de nouvelles substances de référence

Le Centre a poursuivi ses travaux en vue de fournir de nouvelles substances de référence qui seront nécessaires pour accompagner les spécifications de la troisième édition de la *Pharmacopée internationale*. En 1993, six nouvelles substances de référence destinées à accompagner le volume 3 ont été examinées : (-)-3-(4-hydroxy-3-méthoxyphényl)-2-hydrazino-2-méthylalanine, liothyronine sodique, chlorhydrate de néamine, sulfate de néomycine B, chlorhydrate de spectinomycine, et sulfate de vincristine. Les rapports d'analyse pour ces substances figurent aux appendices 10 à 15. Ces substances sont jugées satisfaisantes en vue de leur adoption comme substances chimiques internationales de référence. Le stock de sel d'ammonium de la 4-épitétracycline, N° 180098, était en cours d'épuisement et a été remplacé en 1993 par le chlorhydrate de 4-épitétracycline, N° 293098. On trouvera à l'appendice 9 le rapport d'analyse de cette substance.

Essais de stabilité

Le Centre a poursuivi ses examens périodiques de la stabilité des substances chimiques internationales de référence existantes. En 1993, 15 substances ont été réexaminées. On trouvera les résultats de ce réexamen

à l'appendice 6. On peut obtenir auprès du Centre des détails concernant les méthodes utilisées. Des problèmes de stabilité ayant été soupçonnés, une étude spéciale sur la stabilité à long terme de la nystatine à l'état sec a été effectuée. On en trouvera les résultats à l'appendice 7, ainsi qu'une comparaison avec le deuxième étalon biologique de l'OMS et la substance chimique de référence de la Pharmacopée européenne (EPCRS), lot 1.

Travaux en cours et travaux futurs

Les travaux sur les substances nécessaires pour accompagner les monographies du volume 3 de la *Pharmacopée internationale* se poursuivent. Actuellement, le Centre procède à l'étude de huit des 15 substances énumérées à l'appendice 8.

En 1993, le Centre a reçu quatre boursiers pour des séjours de longue durée : le Dr Ian Matondo, M. Henry Chavarika et Mme Charity Kanjere, du Zimbabwe Regional Drug Control Laboratory, et Mme Wong-Neo Geok Eng, du Department of Scientific Services, Institute of Science and Forensic Medicine, Singapour. Ces boursiers ont étudié les aspects administratifs de la manipulation des substances de référence, ainsi que différentes techniques d'analyse utilisées dans le contrôle des substances chimiques internationales de référence.

En 1993, le Centre a également participé à deux réunions scientifiques : une réunion sur l'assurance de la qualité dans les laboratoires, qui a eu lieu à Jönköping, en Suède, et un symposium international sur la détermination de la pureté des médicaments, qui a eu lieu à Stockholm, Suède, au cours duquel une conférence sur la détermination de la pureté des substances de référence a été donnée.

Questions administratives et financières

Le coût de fonctionnement total du Centre en 1993 a été estimé à US $467 848. Le revenu de la vente de substances de référence a été d'environ US $38 330, et la contribution du Siège de l'OMS de US $18 000. Cela laisse un déficit de US $411 518, couvert grâce au soutien de la Corporation nationale des Pharmacies suédoises.

Le prix des substances reste fixé à US $40 par paquet, et des frais d'expédition et de manutention s'élevant à US $10 sont ajoutés à chaque commande.

Remerciements

Le Centre remercie les laboratoires qui ont contribué à ses travaux en 1993, à savoir le Laboratoire de la Pharmacopée européenne à Strasbourg, France, et les Therapeutic Goods Administration Laboratories, Canberra, Australie.

Le Centre désire également remercier les laboratoires pharmaceutiques qui lui ont fourni des substances pour examen et ont participé aux travaux d'analyse. Cette année, ses remerciements vont en particulier à Bracco Industries Chimica SPA, Milan (Italie); Merck and Co Inc., Rahway, NJ (Etats-Unis d'Amérique); Roussel UCLAF, Romainville (France); et Upjohn PTY Limited, Rydalmere (Etats-Unis d'Amérique).

DISTRIBUTION DE SUBSTANCES CHIMIQUES DE REFERENCE EN 1993

Acéclidine, salicylate	-	échantillon(s)	Dicolinium, iodure	-	échantillon(s)
p-Acétamidobenzalazine	1	"	Dicoumarol	1	"
Acétazolamide	2	"	Diéthylcarbamazine, dihydrogénocitrate	1	"
Allopurinol	3	"	Digitoxine	3	"
2-Amino-5-nitrothiazole	1	"	Digoxine	12	"
3-Aminopyrazole-4-carboxamide,			Dopamine, chlorhydrate	-	"
hémisulfate	1	"	Emétine, chlorhydrate	2	"
Amitryptiline, chlorhydrate	4	"	4-Epianhydrotétracycline,		
Amodiaquine, chlorhydrate	-	"	chlorhydrate	16	"
Amphotéricine B	4	"	4-Epitétracycline, sel d'ammonium	12	"
Ampicilline (anhydre)	5	"	Ergocalciférol	8	"
Ampicilline sodique	7	"	Ergométrine, hydrogénomaléate	4	"
Ampicilline, trihydrate	12	"	Ergotamine, tartrate	2	"
Anhydrotétracycline, chlorhydrate	18	"	Erythromycine	27	
Atropine, sulfate	16	"	Estradiol, benzoate	1	"
Azathioprine	1	"	Estrone	1	"
Bacitracine zinc	2	"	Etacrynique, acide	-	"
Béclométasone, dipropionate	-	"	Ethambutol, chlorhydrate	3	"
Bendazol, chlorhydrate	-	"	Ethinylestradiol	2	"
Benzobarbital	-	"	Ethistérone	2	"
Benzylamine, sulfate	-	"	Ethosuximide	3	"
Benzylpénicilline potassique	12	"	Etocarlide	-	"
Benzylpénicilline sodique	18	"	Flucytosine	2	"
Béphénium, hydroxynaphtoate	-	"	Fluorouracil	3	"
Bétaméthasone	2	"	Fluphénazine, décanoate		
Bétaméthasone, valérate	2	"	(dichlorhydrate)	10	"
Bétanidine, sulfate	1	"	Fluphénazine, énantate		
NN'-bis(2,3-xylyl)anthranilamide	1	"	(dichlorhydrate)	1	"
Bupivacaïne, chlorhydrate	4	"	Fluphénazine, chlorhydrate	2	"
Caféine	2	"	Folique, acide	14	"
Carbamazépine	7	"	3-Formylrifamycine	28	"
Carbénicilline monosodique	2	"	Furosémide	11	"
Chloramphénicol	9	"	Griséofulvine	2	"
Chloramphénicol, palmitate	7	"	Halopéridol	9	"
Chloramphénicol, palmitate (forme A)	2	"	Hydrochlorothiazide	3	"
5-Chloro-2-méthylaminobenzophénone	4	"	Hydrocortisone	7	"
2-(4-Chloro-3-sulfamoylbenzoyl)			Hydrocortisone, acétate	4	"
benzoïque, acide	1	"	(-)-3-(4-Hydroxy-3-méthoxyphényl)		
Chlorphénamine, hydrogénomaléate	-	"	-2-méthylalanine	1	"
Chlorpromazine, chlorhydrate	4	"	Ibuprofène	4	"
Chlortalidone	-	"	Imipramine, chlorhydrate	5	"
Chlortétracycline, chlorhydrate	17	"	Indométacine	4	"
Cimétidine	4	"	o-Iodohippurique, acide	1	"
Clomifène, citrate	3	"	Isoniazide	6	"
Clomifène, citrate (isomère Z)			Lanatoside C	3	"
(voir zuclomifène)			Lévodopa	2	"
Cloxacilline sodique	5	"	Lévothyroxine sodique	3	"
Colécalciférol	6	"	Lidocaïne	9	"
Cortisone, acétate	4	"	Lidocaïne, chlorhydrate	6	"
Dapsone	4	"	Méfénamique, acide	3	"
Désoxycortone, acétate	2	"	Métazide	-	"
Dexaméthasone	5	"	Méthaqualone	-	"
Dexaméthasone, acétate	6	"	Méthyldopa	7	"
Dexaméthasone - acide phosphorique	-	"	Méthyltestostérone	2	"
Dexaméthasone, phosphate sodique	2	"	Méticilline sodique	3	"
Diazépam	5	"	Métronidazole	15	"
Diazoxide	1	"	Nafcilline sodique	2	"
Dicloxacilline sodique	4	"	Néostigmine, métilsulfate	2	"

Nicotinamide	9	échantillon(s)
Nicotinique, acide	5	"
Niridazole	2	"
Niridazole-chloréthylcarboxamide	-	"
Noréthistérone	3	"
Noréthistérone, acétate	4	"
Nystatine	3	"
Ouabaïne	1	"
Oxacilline sodique	9	"
Oxytétracycline, chlorhydrate	20	"
Oxytétracycline, dihydrate	5	"
Papavérine, chlorhydrate	5	"
Phénéticilline potassique	2	"
Phénoxyméthylpénicilline	5	"
Phénoxyméthylpénicilline calcique	-	"
Phénoxyméthylpénicilline potassique	3	"
Phénytoïne	9	"
Prednisolone	6	"
Prednisolone, acétate	4	"
Prednisone	4	"
Prednisone, acétate	4	"
Probénécide	-	"
Procaïne, chlorhydrate	4	"
Procarbazine, chlorhydrate	1	"
Progestérone	3	"
Propicilline potassique	1	"
Propranolol, chlorhydrate	6	"
Propylthiouracile	3	"
Pyrantel, embonate	-	"
Pyridostigmine, bromure	2	"
Réserpine	4	"
Rétinol, acétate (solution à 25 000 UI)	8	"
Riboflavine	7	"
Rifampicine	8	"
Rifampicine quinone	31	"
Sodium, cromoglicate	3	échantillon(s)
Substances de référence pour le point		
de fusion (série de 13 substances)	20	"
Substances de référence individuelles pour le point de fusion		
Azobenzène	15	"
Vanilline	10	"
Benzile	6	"
Acétanilide	-	"
Phénacétine	6	"
Benzanilide	14	"
Sulfanilamide	8	"
Sulfapyridine	6	"
Dicyandiamide	6	"
Saccharine	7	"
Caféine	9	"
Phénolphtaléine	14	"
Sulfaméthoxazole	10	"
Sulfaméthoxypyridazine	-	"
Sulfanilamide	5	"
Sulfasalazine	1	"
Testostérone, propionate	3	"
Tétracycline, chlorhydrate	32	"
Thioacétazone	1	"
4,4'-Thiodianiline	-	"
Thyroxine sodique (voir lévothyroxine sodique)		
Tolbutamide	2	"
Tolnaftate	-	"
Triméthadione	1	"
Triméthoprime	14	"
Triméthylguanidine, sulfate	-	"
Tubocurarine, chlorure	2	"
Vitamine A, acétate (solution) (voir rétinol, acétate)		
Warfarine	4	"
Zuclomifène	6	"

DISTRIBUTION DE SUBSTANCES CHIMIQUES INTERNATIONALES DE REFERENCE DANS LES DIFFERENTES REGIONS DE L'OMS EN 1993

Régions OMS	Nombre de SCIR distribuées en 1993
Région africaine (AFRO)	-
Région des Amériques (AMRO)	
Argentine	10
Brésil	9
Cuba	55
Mexique	4
Région de la Méditerranée orientale (EMRO)	
Chypre	2
Egypte	83
Iran	5
Jordanie	7
Maroc	98
Oman	101
Région européenne (EURO)	
Allemagne	99
Belgique	26
Bulgarie	15
Croatie	6
Danemark	10
Espagne	2
Fédération de Russie	86
Finlande	9
France	4
Grèce	3
Hongrie	4
Italie	17
Norvège	1
Pays-Bas	6
Royaume-Uni	53
Slovaquie	12
Suède	117
Suisse	22
Région de l'Asie du Sud-Est (SEARO)	
Inde	5
Indonésie	10
Mongolie	13
Région du Pacifique occidental (WPRO)	
Australie	5
Philippines	12
Singapour	9

DISTRIBUTION DE SPECTRES INFRAROUGES INTERNATIONAUX DE REFERENCE DANS LES DIFFERENTES REGIONS DE L'OMS EN 1993

Régions OMS	Nombre de SIIR distribués en 1993
Région africaine (AFRO)	
Congo	56
Lesotho	Classeur
Nigéria	250
Région des Amériques (AMRO)	
Costa Rica	16
Jamaïque	50
Région de la Méditerranée orientale (EMRO)	
Egypte	20
Iran	50
Jordanie	31
Oman	37
Région européenne (EURO)	
Malte	71
Suisse (OMS)	50
Région de l'Asie du Sud-Est (SEARO)	
Indonésie	50
Région du Pacifique occidental (WPRO)	
Malaisie	34
Philippines	50

SUBSTANCES CHIMIQUES INTERNATIONALES DE REFERENCE ETABLIES EN 1993

Substance de référence	N° de contrôle	Rapport d'analyse	Remarques
Amodiaquine, chlorhydrate	192160	WHO/PHARM/93.564 Appendice 7	
Bacitracine zinc	192174	WHO/PHARM/93.564 Appendice 8	
Béclométasone, dipropionate	192175	WHO/PHARM/93.564 Appendice 9	
Dexaméthasone - acide phosphorique	192161	WHO/PHARM/93.564 Appendice 10	
Dexaméthasone, phosphate sodique	192158	WHO/PHARM/93.564 Appendice 11	
Dopamine, chlorhydrate	192159	WHO/PHARM/93.564 Appendice 12	
Probénécide	192156	WHO/PHARM/93.564 Appendice 13	
Pyrantel, embonate (pyrantel, pamoate)	192157	WHO/PHARM/93.564 Appendice 14	

LISTE DES SUBSTANCES CHIMIQUES INTERNATIONALES DE REFERENCE DISPONIBLES

1994

Informations générales

Les substances chimiques internationales de référence sont établies conformément à l'avis du Comité OMS d'experts des Spécifications relatives aux Préparations pharmaceutiques. Elles sont fournies principalement pour être utilisées dans des épreuves physiques et chimiques ainsi que dans des dosages décrits dans les spécifications pour le contrôle de la qualité des produits pharmaceutiques publiées dans la Pharmacopée internationale ou proposées sous forme de projets de monographies.

Le mode d'emploi et les données analytiques pour l'usage auquel elles sont destinées dans la spécification correspondante de la Pharmacopée internationale sont fournis dans les certificats joints aux substances distribuées. Des comptes rendus d'analyse plus détaillés sur ces substances peuvent être obtenus sur demande auprès du Centre collaborateur OMS pour les substances chimiques de référence.

Les substances chimiques internationales de référence peuvent être utilisées également dans des épreuves et des dosages qui ne sont pas décrits dans la Pharmacopée internationale. Cependant, dans ce cas, il incombe à l'utilisateur ou à la Commission de la Pharmacopée, ou à toute autre autorité qui a prescrit l'utilisation de ces substances, de vérifier qu'elles conviennent à l'usage qui en est fait.

Il est en général recommandé de conserver les substances à l'abri de la lumière et de l'humidité et de préférence à une température voisine de +5°C. Lorsque des conditions spéciales de stockage sont nécessaires, l'indication en est portée sur l'étiquette ou figure dans la notice jointe aux substances.

La stabilité des substances chimiques internationales de référence conservées au Centre est surveillée par des examens réguliers et, lorsque cela est nécessaire, les substances détériorées sont remplacées par de nouveaux lots. Des listes indiquant les numéros de contrôle des lots en cours sont publiées dans les rapports annuels du Centre et peuvent être obtenues sur demande.

Commandes de substances

Les commandes de substances chimiques internationales de référence doivent être envoyées à :

Centre collaborateur OMS pour les substances chimiques de référence
APOTEKSBOLAGET AB
Centrallaboratoriet
S-10514 STOCKHOLM

(Télex : 115 53 APOBOL S)
(Télécopie : + 46 8 740 60 40)

Les substances chimiques internationales de référence sont exclusivement fournies par paquets standards contenant la quantité indiquée sur la liste ci-après.

Substance de référence	Conditionnement	N° de contrôle
Acéclidine, salicylate	100 mg	172048
p-Acétamidobenzalazine	100 mg	290042
Acétazolamide	100 mg	186128
Allopurinol	100 mg	287049
2-Amino-5-nitrothiazole	25 mg	186131
3-Aminopyrazole-4-carboxamide, hémisulfate	100 mg	172050
Amitryptiline, chlorhydrate	100 mg	181101
Amodiaquine, chlorhydrate	200 mg	192160
Amphotéricine B	400 mg	191153
Ampicilline (anhydre)	200 mg	390001
Ampicilline sodique	200 mg	388002
Ampicilline, trihydrate	200 mg	274003
Anhydrotétracycline, chlorhydrate	25 mg	180096
Atropine, sulfate	100 mg	183111
Azathioprine	100 mg	172060
Bacitracine zinc	200 mg	192174
Béclométasone, dipropionate	200 mg	192175
Bendazol, chlorhydrate	100 mg	173066
Benzobarbital	100 mg	172051
Benzylamine, sulfate	100 mg	172052
Benzylpénicilline potassique	200 mg	180099
Benzylpénicilline sodique	200 mg	280047
Béphénium, hydroxynaphtoate	100 mg	183112
Bétaméthasone	100 mg	183113
Bétaméthasone, valérate	100 mg	190145
Bétanidine, sulfate	100 mg	172053
NN'-bis(2,3-xylyl)anthranilamide	50 mg	173067
Bupivacaïne, chlorhydrate	100 mg	289054
Caféine	100 mg	181102
Carbamazépine	100 mg	189143
Carbénicilline monosodique	200 mg	383043
Chloramphénicol	200 mg	486004
Chloramphénicol, palmitate	1 g	286072
Chloramphénicol, palmitate (forme A)	200 mg	175073
5-Chloro-2-méthylaminobenzophénone	100 mg	172061
2-(4-Chloro-3-sulfamoylbenzoyl)benzoïque, acide	50 mg	181106
Chlorphénamine, hydrogénomaléate	100 mg	182109
Chlorpromazine, chlorhydrate	100 mg	178080
Chlortalidone	100 mg	183114
Chlortétracycline, chlorhydrate	200 mg	187138
Cimétidine	100 mg	190150
Clomifène, citrate	100 mg	187136
Clomifène, citrate (isomère Z) (voir zuclomifène)		
Cloxacilline sodique	200 mg	274005
Colécalciférol (vitamine D_3)	500 mg	190146
Cortisone, acétate	100 mg	167006
Dapsone	100 mg	183115
Désoxycortone, acétate	100 mg	167007
Dexaméthasone	100 mg	388008
Dexaméthasone, acétate	100 mg	288009
Dexaméthasone - acide phosphorique	100 mg	192161
Dexaméthasone, phosphate sodique	100 mg	192158
Diazépam	100 mg	172062
Diazoxide	100 mg	181103
Dicloxacilline sodique	200 mg	174071
Dicolinium, iodure	100 mg	172055
Dicoumarol	100 mg	178077
Diéthylcarbamazine, dihydrogénocitrate	100 mg	181100

Substance de référence	Conditionnement	N° de contrôle
Digitoxine	100 mg	277010
Digoxine	100 mg	587011
Dopamine, chlorhydrate	100 mg	192159
Emétine, chlorhydrate	100 mg	187134
4-Epianhydrotétracycline, chlorhydrate	25 mg	288097
4-Epitétracycline, chlorhydrate	25 mg	293098
Ergocalciférol (vitamine D_2)	500 mg	190147
Ergométrine, hydrogénomaléate	50 mg	277012
Ergotamine, tartrate	50 mg	385013
Erythromycine	250 mg	191154
Estradiol, benzoate	100 mg	167014
Estrone	100 mg	279015
Etacrynique, acide	100 mg	281056
Ethambutol, chlorhydrate	100 mg	179081
Ethinylestradiol	100 mg	291016
Ethistérone	100 mg	167017
Ethosuximide	100 mg	179088
Etocarlide	100 mg	172057
Flucytosine	100 mg	184121
Fluorouracil	100 mg	184122
Fluphénazine, chlorhydrate	100 mg	176076
Fluphénazine, décanoate (dichlorhydrate)	100 mg	182107
Fluphénazine, énantate (dichlorhydrate)	100 mg	182108
Folique, acide	100 mg	388019
3-Formylrifamycine	200 mg	190149
Furosémide	100 mg	171044
Griséofulvine	200 mg	280040
Halopéridol	100 mg	172063
Hydrochlorothiazide	100 mg	179087
Hydrocortisone	100 mg	283020
Hydrocortisone, acétate	100 mg	280021
(-)-3-(4-Hydroxy-3-méthoxyphényl)-2-hydrazino-2-méthylalanine (3-O-Méthylcarbidopa)	25 mg	193180
(-)-3-(4-Hydroxy-3-méthoxyphényl)-2-méthylalanine	25 mg	179085
Ibuprofène	100 mg	183117
Imipramine, chlorhydrate	100 mg	172064
Indométacine	100 mg	178078
o-Iodohippurique, acide	100 mg	171045
Isoniazide	100 mg	185124
Lanatoside C	100 mg	281022
Lévodopa	100 mg	172065
Lévothyroxine sodique	100 mg	189144
Lidocaïne	100 mg	181104
Lidocaïne, chlorhydrate	100 mg	181105
Liothyronine sodique	50 mg	193179
Méfénamique, acide	100 mg	173068
Métazide	100 mg	172058
Méthaqualone	100 mg	173069
Méthyldopa	100 mg	179084
Méthyltestostérone	100 mg	167023
Méticilline sodique	200 mg	274024
Métronidazole	100 mg	183118
Nafcilline sodique	200 mg	272025
Néamine, chlorhydrate	0,5 mg	193177
Néomycine B, sulfate	200 mg	193178
Néostigmine, métilsulfate	100 mg	187135
Nicotinamide	100 mg	179090

Substance de référence	Conditionnement	N° de contrôle
Nicotinique, acide	100 mg	179091
Niridazole	200 mg	186129
Niridazole-chloréthylcarboxamide	25 mg	186130
Noréthistérone	100 mg	186132
Noréthistérone, acétate	100 mg	185123
Nystatine	200 mg	191152
Ouabaïne	100 mg	283026
Oxacilline sodique	200 mg	382027
Oxytétracycline, chlorhydrate	200 mg	189141
Oxytétracycline, dihydrate	200 mg	189142
Papavérine, chlorhydrate	100 mg	185127
Phénéticilline potassique	200 mg	167028
Phénoxyméthylpénicilline	200 mg	179082
Phénoxyméthylpénicilline calcique	200 mg	179083
Phénoxyméthylpénicilline potassique	200 mg	176075
Phénytoïne	100 mg	179089
Prednisolone	100 mg	389029
Prednisolone, acétate	100 mg	289030
Prednisone	100 mg	167031
Prednisone, acétate	100 mg	169032
Probénécide	100 mg	192156
Procaïne, chlorhydrate	100 mg	183119
Procarbazine, chlorhydrate	100 mg	184120
Progestérone	100 mg	167033
Propicilline potassique	200 mg	274034
Propranolol, chlorhydrate	100 mg	187139
Propylthiouracile	100 mg	185126
Pyrantel, embonate	500 mg	192157
Pyridostigmine, bromure	100 mg	182110
Réserpine	100 mg	186133
Rétinol, acétate (solution)	5 capsules*	791038
Riboflavine	250 mg	382035
Rifampicine	200 mg	191151
Rifampicine quinone	200 mg	190148
Sodium, cromoglicate	100 mg	188140
Substances de référence pour le point de fusion		
Azobenzène (69°C)	4 g	192168
Vanilline (83°C)	4 g	192169
Benzile (96°C)	4 g	192170
Acétanilide (116°C)	4 g	192171
Phénacétine (136°C)	4 g	192172
Benzanilide (165°C)	4 g	192173
Sulfanilamide (166°C)	4 g	192162
Sulfapyridine (193°C)	4 g	192163
Dicyandiamide (210°C)	4 g	192164
Saccharine (229°C)	4 g	192165
Caféine (237°C)	4 g	192166
Phénolphtaléine (263°C)	4 g	192167
Spectinomycine, chlorhydrate	200 mg	193176
Sulfaméthoxazole	100 mg	179092
Sulfaméthoxypyridazine	100 mg	178079
Sulfanilamide	100 mg	179094
Sulfasalazine	100 mg	191155
Testostérone, propionate	100 mg	167036
Tétracycline, chlorhydrate	200 mg	180095
Thioacétazone	100 mg	171046

* Par capsule, environ 9 mg dans 250 mg d'huile.

Substance de référence	Conditionnement	N° de contrôle
4,4'-Thiodianiline	50 mg	183116
Thyroxine sodique (voir lévothyroxine sodique)		
Tolbutamide	100 mg	179086
Tolnaftate	100 mg	176074
Triméthadione	200 mg	185125
Triméthoprime	100 mg	179093
Triméthylguanidine, sulfate	100 mg	172059
Tubocurarine, chlorure	100 mg	170037
Vincristine, sulfate	9,7 mg/flacon	193181
Vitamine A, acétate (solution) (voir rétinol, acétate)		
Warfarine	100 mg	168041
Zuclomifène	50 mg	187137

ESSAIS DE STABILITE

La stabilité des substances chimiques internationales de référence pendant leur stockage est surveillée par un réexamen périodique des substances détenues par le Centre. Les résultats obtenus pour les substances réexaminées en 1993 sont résumés ci-après. A titre comparatif, on a aussi indiqué les résultats obtenus lors des réexamens précédents. Les substances ont été conservées dans des récipients étanches à +5°C et sous une humidité relative d'environ 30 %. Dans les tableaux, on a adopté les abréviations suivantes :

DSC	Calorimétrie différentielle
DTA	Analyse thermique différentielle
HPLC	Chromatographie liquide à haute performance
IR	Spectrophotométrie infrarouge
KF	Méthode de Karl Fischer pour la détermination de la teneur en eau
LOD	Perte à la dessiccation
TLC	Chromatographie en couche mince
PSA	Analyse de solubilité par phases
TGA	Analyse thermogravimétrique

La valeur estimée des impuretés solides totales, obtenue par HPLC et TLC, est exprimée en aire %, sauf indication contraire; lorsqu'elle est obtenue par DSC et par DTA, elle est exprimée en mole %, et par PSA en poids %. Les pertes de poids, mesurées par LOD et TGA, sont exprimées en poids %. Les valeurs obtenues par titrage sont calculées par rapport à la substance desséchée ou anhydre, sauf indication contraire.

Pour plus de détails sur les méthodes d'analyse utilisées, on peut s'adresser au Centre.

Allopurinol, N° de contrôle 287049

Premier rapport d'analyse : WHO/PHARM/88.537, appendice 6

	Année d'examen	
	1987	**1993**
IR	conforme	-
TLC, %	0 tache secondaire	<0,1 1 tache
HPLC, %	0,02	<0,1 (nouveau système)
TGA, %	<0,1	~0,1

3-Aminopyrazole-4-carboxamide, hémisulfate, N° de contrôle 172050

Premier rapport d'analyse : WHO/PHARM/72.471, appendice 10

	Année d'examen				
	1972	**1975**	**1981**	**1985**	**1993**
IR	conforme	-	-	conforme	-
TLC, %	0 tache secondaire	-	-	2 faibles taches secondaires (250 µg)	<0,1 1 faible tache secondaire
HPLC, %	-	-	-	-	0,05
TGA, %	-	-	-	-	5,0
Eau (KF), %	13,7	11,2	10,8	10,4* ∫ 5,2**	-
Titrage (potentiométrique)	99,8	99,6	99,5	100,3	-

* Anciens flacons.
** Produit en vrac, fourni en 1985.

Amitriptyline, chlorhydrate, N° de contrôle 181101

Premier rapport d'analyse : WHO/PHARM/82.509, appendice 6

	Année d'examen		
	1982	**1985**	**1993**
IR	conforme	conforme	-
TLC, %	<0,1	<0,1	-
HPLC, %	<0,1	<0,1	<0,1
TGA, %	-	-	0,2
KF, %	-	0,1	-
LOD, %	0,1	0,1	-
Titrage, % (potentiométrique)	100,3	100,3	-
Titrage, HPLC, %	-	-	100,0
DTA, %	0,3	0,4	-
PSA, %	0,3	-	-

Bétaméthasone, valérate, N° de contrôle 190145

Premier rapport d'analyse : WHO/PHARM/91.555, appendice 8

	Année d'examen	
	1990	**1993**
IR	conforme	-
TLC, %	0,2	-
HPLC, %	0,3	0,2
TGA, %	<0,1	0,2
Titrage, % (titrimétrique)	99,8	-
Titrage, % (spectrophotométrique)	100,3	-

Chlortétracycline, chlorhydrate, N° de contrôle 187138

Premier rapport d'analyse : WHO/PHARM/88.537, appendice 7

	Année d'examen	
	1987	**1993**
IR	conforme	-
TLC, %	<0,1	-
HPLC, %	0,5 (tétracycline)	0,7 (tétracycline) 0,8 (inconnu)
TGA, %	0,15	0,23
Titrage (microbiologique)	1001 UI/mg	1043 UI/mg*
Titrage, % (HPLC)	-	100,0*

* 2e étalon biolgique OMS, 1000 UI/mg, utilisé comme substance de référence.

Ergométrine, hydrogénomaléate, N° de contrôle 277012

Premier rapport d'analyse : WHO/PHARM/78.494, appendice 5

	Année d'examen			
	1977	**1982**	**1989**	**1993**
IR	conforme	-	-	-
TLC, %	1 (3 taches secondaires)	(2-3 taches secondaires)	0,8 (4 taches secondaires)	-
HPLC, %	0,8	0,9	-	0,5
TGA, %	-	-	0,3	0,5
LOD, %	0,8	-	0,3	-
Titrage, % (potentiométrique)	100,0	99,9	-	-

Ergotamine, tartrate, N° de contrôle 385013

Premier rapport d'analyse : WHO/PHARM/86.527, appendice 6

	Année d'examen	
	1985	**1993**
IR	conforme	-
TLC, %	2 taches secondaires	-
HPLC, %	0,2 (210 nm)	1,1* (235 nm)
TGA, %	-	4,2
LOD, %	2,4	3,2
Titrage, % (titrimétrique)	99,2	-
GC, méthanol, %	0,9	-

* Ce chiffre plus élevé est dû à un nouveau système ayant une meilleure efficacité de séparation, non à une dégradation.

Estrone, N° de contrôle 279015

Premier rapport d'analyse : WHO/PHARM/79.499, appendice 6

	Année d'examen		
	1979	**1984**	**1993**
IR	conforme	-	-
TLC, %	0,2	-	-
HPLC, %	≈0,15 (280 nm)	0,1 (280 nm)	0,1 (278 nm) 0,2 (220 nm)
TGA, %	-	-	<0,1
LOD, %	<0,1	-	-

Griséofulvine, N° de contrôle 280040

Premier rapport d'analyse : WHO/PHARM/81.508, appendice 10

	Année d'examen		
	1980	**1988**	**1993**
IR	conforme	conforme	-
TLC, %	1 tache	0,5-1	0,4
HPLC, %	0,6	0,6 (236 nm) 0,9 (291 nm)	0,8 (236 nm)* 1,1 (291 nm)
TGA, %	-	<0,1	<0,1
LOD, %	0,1	-	-
Titrage, % (potentiométrique)	100,0	99,5	-

* Ces valeurs plus élevées sont dues à une meilleure efficacité de la séparation sur la colonne, non à une dégradation.

Ibuprofène, N° de contrôle 183117

Premier rapport d'analyse : WHO/PHARM/84.513, appendice 12

	Année d'examen	
	1983	**1993**
IR	conforme	-
TLC, %	0,7	-
HPLC, %	0,7 (264 nm)	0,6 (220 nm) 0,5 (263 nm)
TGA, %	-	<0,1
LOD, %	<0,1	-
Titrage, % (HPLC)	-	99,6
Titrage, % (titrimétrique)	99,5	-

Imipramine, chlorhydrate, N° de contrôle 172064

Premier rapport d'analyse : WHO/PHARM/73.475, appendice 7

	Année d'examen				
	1972	**1977**	**1983**	**1988**	**1993**
IR	conforme	conforme	-	conforme	-
TLC, %	4 taches secondaires	3 taches secondaires	3 taches secondaires	3 taches secondaires	4 taches secondaires
HPLC, %, 237 nm	-	-	-	-	0,1
HPLC, % titrage	-	-	-	-	100,5*
TGA, %	-	-	-	-	0,06
LOD, %	<0,1	0,05	<0,1	0,08	-
Titrage, % (titrimétrique)	99,9	99,1	99,1	99,2	-
DSC, %	0,2	-	-	0,2	-

* EPCRS lot 1, avec une teneur de 99,7 %, utilisé comme substance de référence.

Métronidazole, N° de contrôle 183118

Premier rapport d'analyse : WHO/PHARM/84.513, appendice 13

	Année d'examen	
	1983	**1993**
IR	conforme	-
TLC, %	0,1	-
HPLC, %	<0,2	0,1
TGA, %	-	<0,1
LOD, %	<0,1	-
Titrage, % (titrimétrique)	100,1	-

Nystatine, N° de contrôle 191152

Premier rapport d'analyse : WHO/PHARM/92.558, appendice 10

	Année d'examen		
	1991	**1992**	**1993**
HPLC, % impuretés, 304 nm	5,0	-	7,9*
HPLC, titrage, %	100,0	-	100,0
TGA, %	5,0	-	5,2
Titrage (microbiologique)	6382 UI/mg**	5208 UI/mg***	4968 UI/mg***
TLC, %	4,1	-	3 taches secondaires
UV, titrage, 304 nm, %	100,0	-	100,0

* Ces valeurs élevées sont dues à un nouveau système chromatographique ayant une meilleure efficacité de séparation.

** L'EPCRS, dont la teneur figurant sur l'étiquette est fausse, a été utilisé comme étalon.

*** Le 2e étalon biologique OMS, dont la teneur déclarée est de 4855 UI/mg, a été utilisé comme étalon. Aucune dégradation de la SCIR n'a été observée. Voir étude séparée à l'appendice 7.

Propranolol, chlorhydrate, N° de contrôle 187139

Premier rapport d'analyse : WHO/PHARM/88.537, appendice 13

	Année d'examen	
	1987	**1993**
IR	conforme	-
TLC, %	<0,1	-
TGA, %	-	<0,1
HPLC, %	0,2	0,2
LOD, %	<0,1	-
DTA, %	0,2	-
Titrage, % (spectrophotométrique)	100,5	-
Titrage, % (titrimétrique)	100,0	-
Titrage, % (HPLC)	100,6	-

Tétracycline, chlorhydrate, N° de contrôle 180095

Premier rapport d'analyse : WHO/PHARM/81.508, appendice 12

	Année d'examen			
	1980	**1985**	**1989**	**1993**
HPLC, poids % de 4-épitétracycline anhydrotétracycline 4-épianhydrotétracycline non identifié, aire %	 1,3 0,1 <0,5 ~0,05	 0,7 0,1 0,05 0,1	 0,7 <0,05 <0,05 -	 ≈1,0 - - -
Perte à la dessiccation, %	0,25	-	-	-
Eau (KF), %	0,4	0,3	-	-
TLC	1 tache secondaire	-	-	-
Titrage, % (potentiométrique)	99,6	-	-	-
TGA, %	-	-	0,3	0,3

ETUDE DE STABILITE DE LA NYSTATINE A L'ETAT SEC

Monika Westermark

Centre collaborateur OMS pour les substances chimiques de référence

Le point

Lorsque la substance chimique internationale de référence (ICRS) pour la nystatine, ICRS 191152, a été établie en 1991, elle a fait l'objet d'un titrage microbiologique par rapport à l'EPCRS, de teneur déclarée 4980 UI/mg (novembre 1991). Environ un an plus tard (août 1992), le titrage microbiologique a été refait, mais cette fois par rapport au deuxième étalon biologique de l'OMS, de teneur déclarée 4855 UI/mg. Le résultat de cet essai a montré, pour la substance chimique internationale de référence, une baisse d'activité de 6106 UI/mg à 5208 UI/mg en un an. Comme nous ne pensions pas que l'ICRS soit très instable, nous avons effectué la présente étude de stabilité (juillet-août 1993) sur des échantillons de l'ICRS, soumis à des conditions défavorables, pour rechercher quelles sont les conditions qui entraînent une dégradation du produit. Les échantillons ont été testés par différentes techniques (HPLC, TLC, TG, UV et titrage microbiologique) pour évaluer le degré de dégradation.

Selon les définitions de la Pharmacopée internationale et de la Pharmacopée européenne, la nystatine est un mélange de substances produites par la croissance de certaines souches de *Streptomyces noursei*. Elle contient principalement des tétraènes, dont le principal est la nystatine A_1. Son activité est au moins égale à 4400 UI/mg, exprimée par rapport à la substance desséchée.

Conclusion

L'ICRS 191152 pour la nystatine est une substance stable dans les conditions normales de stockage. Pour subir une dégradation importante, elle doit être soumise à des conditions défavorables. La nystatine est très sensible à la chaleur et à la lumière, et assez sensible à l'humidité. L'EPCRS ne possédait probablement pas l'activité indiquée sur l'étiquette de 1991, ce qui a donné à l'époque une valeur faussement élevée à l'ICRS. Voir également le Tableau récapitulatif en fin de rapport.

Echantillons testés

Les échantillons ci-dessous ont été étudiés :

1. Substance chimique internationale de référence pour la nystatine, ICRS 191152.

2. Deuxième étalon biologique de l'OMS, 1982, pour la nystatine, avec une teneur déclarée de 4855 UI/mg.

3. Substance chimique de référence de la Pharmacopée européenne (EPCRS), lot 1, pour la nystatine, avec une teneur déclarée de 4980 UI/mg.

4. ICRS 191152, soumis à l'humidité, 20°C, HR 98 %, 14 jours, récipients ouverts, à l'abri de la lumière.

5. ICRS 191152, soumis à la chaleur, 105°C, 20 heures, récipients ouverts, à l'abri de la lumière.

6. ICRS 191152, soumis à la lumière, 20°C, 18 jours, récipients ouverts, à la lumière du jour (fenêtre du laboratoire).

Récipients

Le deuxième étalon biologique est réparti en ampoules scellées en verre blanc.

L'EPCRS est réparti en flacons capsulés en verre blanc.

L'ICRS est réparti en flacons capsulés en verre coloré.

Résultats des différentes techniques d'analyse

Les différents échantillons de nystatine ont été étudiés par les méthodes d'analyse suivantes :

A. Chromatographie en phase liquide, titrage + pureté + matrices de diodes

B. Titrage microbiologique

C. Chromatographie en couche mince

D. Spectrophotométrie UV

E. Analyse thermogravimétrique.

Les résultats et la description des méthodes sont donnés ci-après. Sauf indication contraire, tous les calculs se rapportent à la substance desséchée.

A. Chromatographie en phase liquide

Système 1 : Titrage (+ pureté)

Le système suivant a été utilisé :

Colonne : Kromasil C-18, 150 mm x 3 mm.

Eluant : Acétonitrile à 30 % dans du tampon phosphate 0,067 M, pH 6,5. Le tampon a été préparé en dissolvant 7,428 g de $Na_2HPO_4.2H_2O$ et 12,466 g de KH_2PO_4 dans 2000 ml d'eau.

Détecteur : Schimadzu SPD-6AV ou Varian UV 100, à 304 nm.

Pompe : LDC Constametric III ou Varian Vista 5500, à un débit de 1 ml/min.

Intégrateur : PeakPro (Beckman).

Echantillon : 0,01 mg/ml dissous dans le méthanol pour le titrage (meilleure stabilité et solubilité) ou dans l'éluant pour les déterminations de la pureté.

Le titrage a également été répété sur une autre colonne de Kromasil. Les résultats sont donnés au Tableau 1.

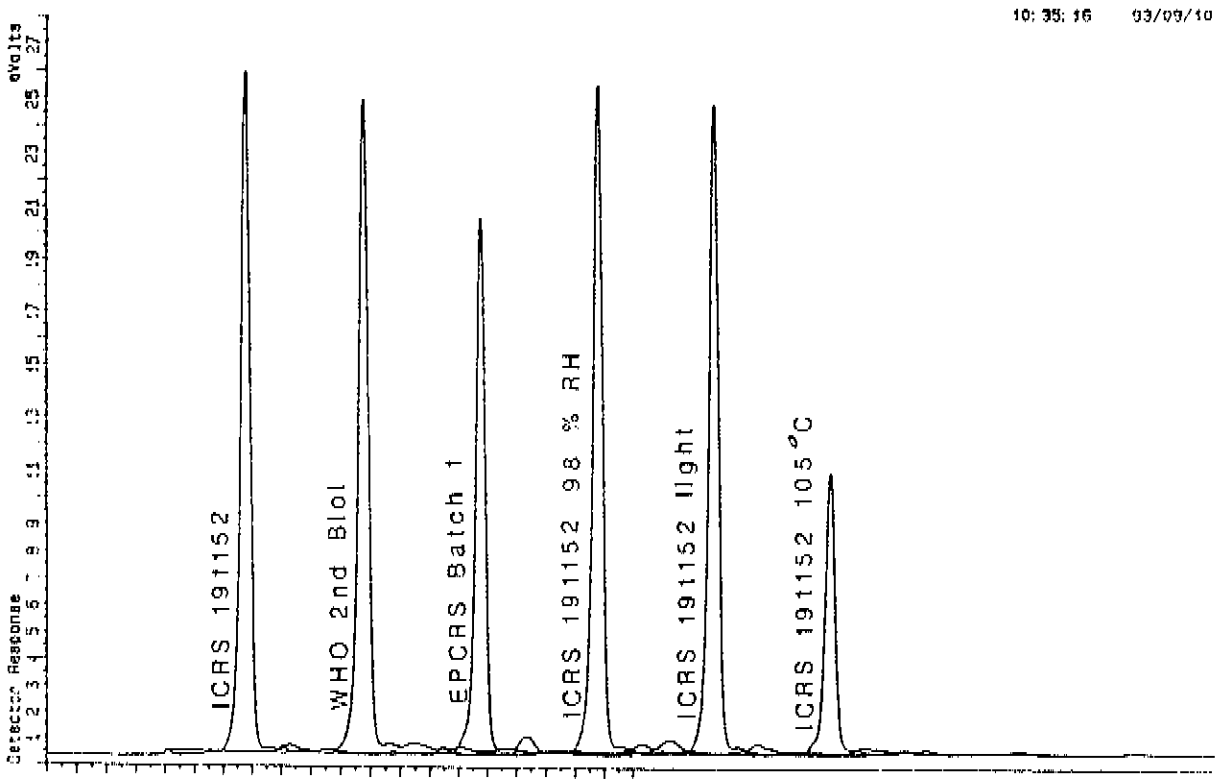
TABLEAU 1

Substance	Titrage, exprimé en % de l'ICRS (n = 2) Colonne 1	Titrage, exprimé en % de l'ICRS (n = 2) Colonne 2		% impuretés, exprimé en aire %*
		Analyse 1	Analyse 2	
ICRS 191152	100,0 %	100,0 %	100,0 %	6,9
2e étalon biologique OMS	85,6 %	85,8 %	88,1 %	11,3
EPCRS lot 1	79,5 %	79,0 %	79,3 %	12,0
ICRS 191152, 98 % HR 14 jours, 20°C	95,9 %	-	-	6,1
ICRS 191152, 105°C 20 heures	40,8 %	-	-	10,7
ICRS 191152, lumière du jour 18 jours, 20°C	88,3 %	-	-	9,3

(- = échantillons épuisés, voir pureté sous système 2.)
(* Le système 2, Tableau 2, est plus optimisé pour la détermination de la pureté.)
Voir Figure 1, un chromatogramme montrant les résultats du titrage.

Lorsque deux séries de six injections successives ont été faites avec une solution de 20 μg/ml d'ICRS 191152 dans le méthanol, le RSD était d'environ 0,5 %.

FIGURE 1. CHROMATOGRAMMES EN PHASE LIQUIDE DES DIFFERENTS ECHANTILLONS DE NYSTATINE



L'ICRS 191152 avait la plus forte teneur en nystatine A_1. Une dégradation se produit lorsque la substance est soumise à des conditions défavorables, surtout la chaleur et la lumière, mais également en cas de forte humidité.

Système 2 : Pureté

Colonne : Vydac 300Å, 250 mm x 4,6 mm.

Eluant : Acétonitrile:méthanol:tampon comme dans le système 1 (28:6:66 ou 29:6:65).

Détecteur : Waters Lambda Max 481
Varian 9065 Polychrome à 302 nm.

Pompe : Waters 600 E ou Varian 9012, à un débit de 1 ml/min.

Intégrateur : PeakPro (Beckman).

Echantillon : 0,5 mg/ml dissous dans la phase mobile.

L'analyse a été effectuée à deux reprises.

Les résultats sont donnés au Tableau 2.

TABLEAU 2

Substance	% impuretés, exprimé en aire %	
	Analyse 1	Analyse 2
ICRS 191152	8,1 % (n = 4)	7,6 % (n = 2)
2° étalon biologique OMS	12,9 % (n = 2)	11,3 % (n = 2)
EPCRS lot 1	10,0 % (n = 2)	12,2 % (n = 2)
ICRS 191152, 98 % HR 14 jours, 20°C	9,0 % (n = 2)	6,8 % (n = 2)
ICRS 191152, 105°C 20 heures	15,1 % (n = 2)	14,6 % (n = 2)
ICRS 191152, lumière du jour 18 jours, 20°C	9,8 % (n = 2)	10,3 % (n = 2)

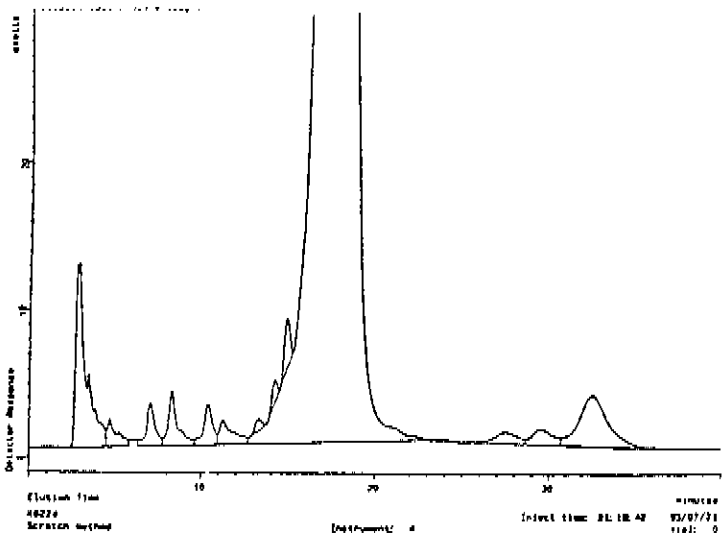
La Figure 2 donne les chromatogrammes des essais de pureté pour l'ICRS 191152, le deuxième étalon biologique OMS et l'EPCRS, et la Figure 3 les chromatogrammes des échantillons d'ICRS 191152 soumis à des conditions défavorables.

Les résultats concernant les impuretés sont assez variables. Le deuxième étalon biologique OMS montre un important pic à environ 33 min, estimé à 4,6 %. Ce pic est également présent dans l'échantillon d'ICRS 191152 (environ 2 %), mais non dans l'EPCRS. Il est plus faible dans les échantillons d'ICRS 191152 soumis à des conditions défavorables, notamment dans l'échantillon soumis à la chaleur, comme le montre la Figure 3. L'EPCRS montre un profil d'impuretés différent, avec un pic à environ 11 min, qui se forme également dans l'échantillon soumis à la chaleur (voir Figure 3). Il présente aussi des impuretés s'éluant précocement, avant 4 min, dont les pics sont également augmentés dans l'échantillon d'ICRS 191152 soumis à la chaleur (voir Figure 3).

FIGURE 2. CHROMATOGRAMMES DES ESSAIS DE PURETE DE DIFFERENTES SUBSTANCES DE REFERENCE POUR LA NYSTATINE

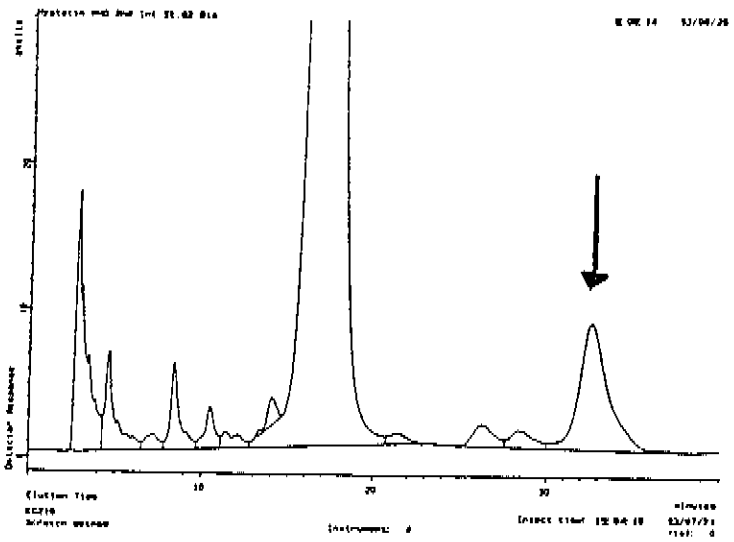
ICRS 191152

8.1%



WHO 2nd Biol Standard

12.9%



EPCRS Batch 1

9.0 %

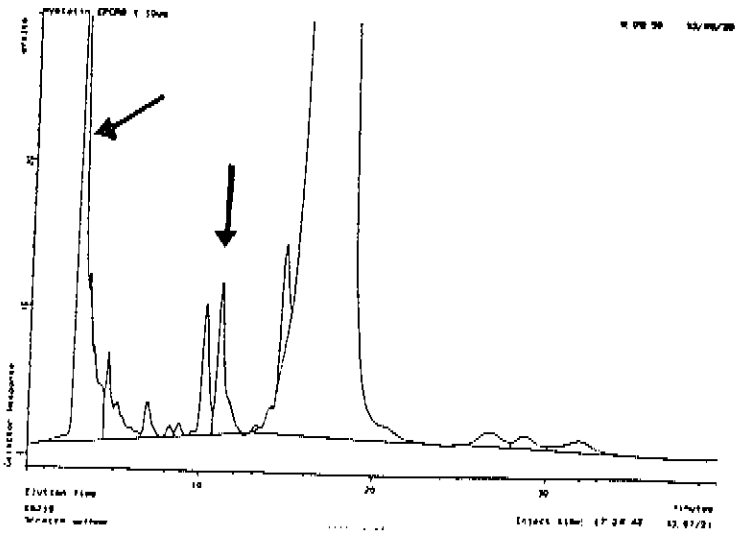


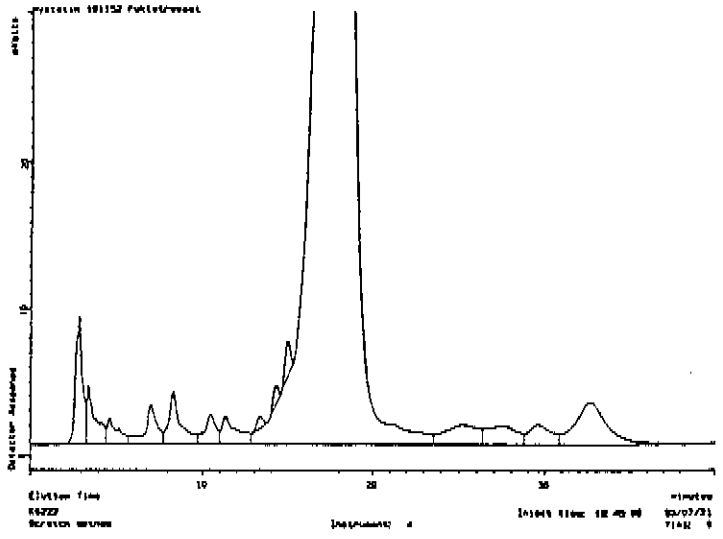
FIGURE 3. CHROMATOGRAMMES DES ESSAIS DE PURETE DES ECHANTILLONS D'ICRS 191152 SOUMIS A DES CONDITIONS DEFAVORABLES

ICRS 191152

98%RH

14 days 20 °C

9.0%

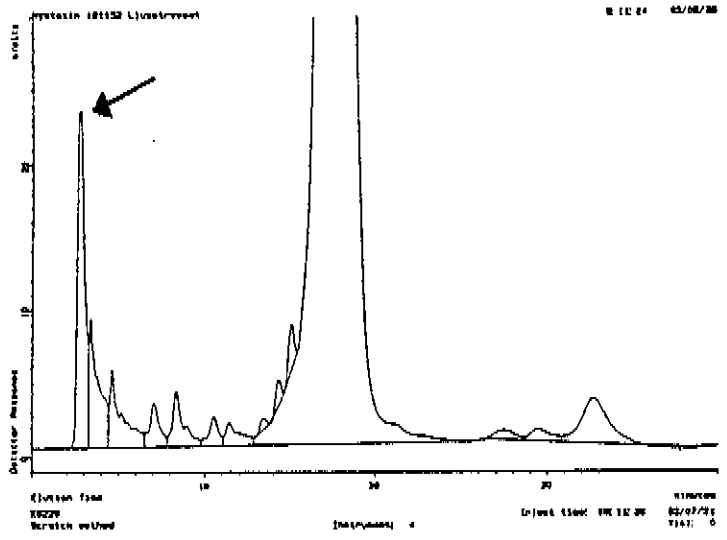


ICRS 191152

daylight

18 days 20 °C

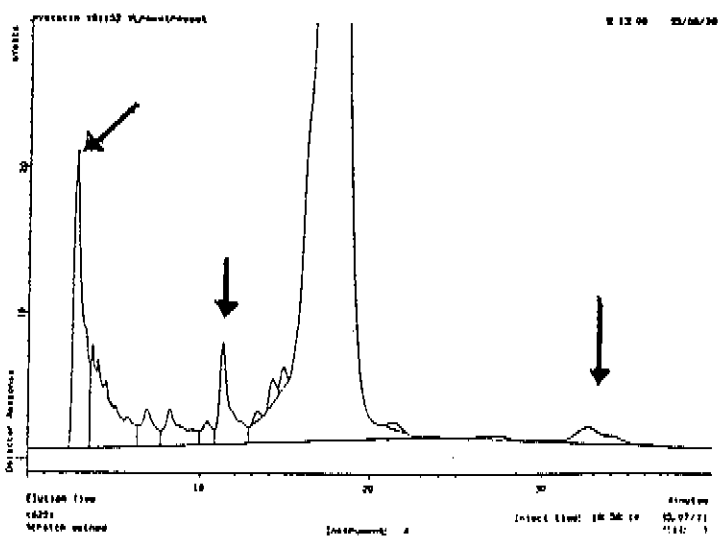
9.8 %



ICRS 191152

105 °C 20 hours

15.1 %



Il est clairement démontré que l'exposition à la chaleur entraîne une augmentation des produits de dégradation (premiers pics d'élution) et une baisse significative du pic de la nystatine A_1 (voir titrage). Les mêmes phénomènes s'observent avec l'échantillon soumis à la lumière.

Lorsque nous avons comparé ces profils de pureté sur la colonne Vydac (système 2) et sur la colonne Kromasil (système 1), nous avons trouvé une sélectivité et un ordre de rétention différents. Le système avec colonne Vydac ne convenait pas pour le titrage. Nous n'avons pas obtenu de résultats reproductibles, probablement en raison de la forte charge de cette colonne (adsorption ?). Nous avons également observé une tendance à la détérioration de la colonne; c'est probablement la raison pour laquelle les valeurs obtenues pour les impuretés varient légèrement entre l'analyse 1 et l'analyse 2.

Détecteur à matrices de diodes

Tous les pics supplémentaires observés lors de l'essai de pureté avec la colonne Vydac (système 2) ont été examinés avec un détecteur Varian 9065 Polychrom. Les maxima UV pour la nystatine A_1 et pour la majeure partie des pics supplémentaires ont été trouvés à 229, 292, 306 et 321 nm. La seule exception est le premier pic de tous les chromatogrammes, qui s'élue à 2,8-3 min et présente un spectre différent, avec des maxima à 234 et 273 nm.

B. Titrage microbiologique

Les échantillons étudiés ont également fait l'objet d'un titrage microbiologique conformément à la deuxième édition de la *Pharmacopée européenne*. Nous avons pris comme référence le deuxième étalon biologique de l'OMS, dont la teneur déclarée est de 4855 UI/mg.

Les résultats sont indiqués au Tableau 3.

TABLEAU 3

Substance	UI/mg	% de l'ICRS "en l'état"
ICRS 191152	4968	100,0
2e étalon biologique OMS	teneur déclarée 4855	97,7
EPCRS lot 1	4221 (teneur déclarée 4980)	85,0
ICRS 191152, 98 % HR 14 jours, 20°C	4605	92,7
ICRS 191152, 105°C 20 heures	1930	38,8
ICRS 191152, lumière du jour 18 jours, 20°C	4074	82,0

Les résultats concordent raisonnablement avec ceux du titrage par chromatographie en phase liquide (voir Tableau 1), sauf pour le deuxième étalon biologique de l'OMS, qui donne une valeur élevée par titrage microbiologique, mais non par titrage chimique. L'impureté formant un pic à 33 min (voir Figure 2), absente de l'EPCRS, pourrait être à l'origine de cette différence.

L'ICRS 191152, stocké dans des conditions normales, à +5°C en récipients fermés, a également été suivi par titrage microbiologique pendant environ 1,5 an.

Les résultats sont donnés au Tableau 4.

TABLEAU 4

Date de l'analyse	ICRS 191152 UI/mg	Substance de référence utilisée
Novembre 1991	6106	EPCRS, teneur déclarée 4980 UI/mg
Août 1992	5208 (n = 6)	2e étalon biologique OMS, teneur déclarée 4855 UI/mg
Mars 1993	5166 (n = 2)	2e étalon biologique OMS, teneur déclarée 4855 UI/mg
Juin 1993	4968 (n = 2)	2e étalon biologique OMS, teneur déclarée 4855 UI/mg

La baisse de teneur entre novembre 1991 et août 1992 résulte du changement de substance de référence utilisée. Pour l'EPCRS, la teneur mesurée était plus faible que la teneur déclarée sur l'étiquette (voir Tableau 3). Les données brutes pour le reste du tableau ont fait l'objet d'un traitement statistique par un test-t non apparié, et aucune dégradation statistiquement significative n'a été trouvée au niveau de confiance 95 %.

C. Chromatographie en couche mince

Les échantillons ont également été examinés par chromatographie en couche mince.

Le système suivant a été utilisé :

Système : Selon *Journal of Chromatography*, **216:** 367-373 (1981).

Couche mince : Gel de silice 60, F-254 (Merck).

Eluant : n-Amylalcool:acide acétique glacial:eau (2:1:1).

Echantillon : 100 µg de nystatine; des solutions à 5 mg/ml dans le méthanol ont été préparées.

Visualisation : dans l'ultraviolet à 254 nm, évaluation par densitométrie à 304 nm.

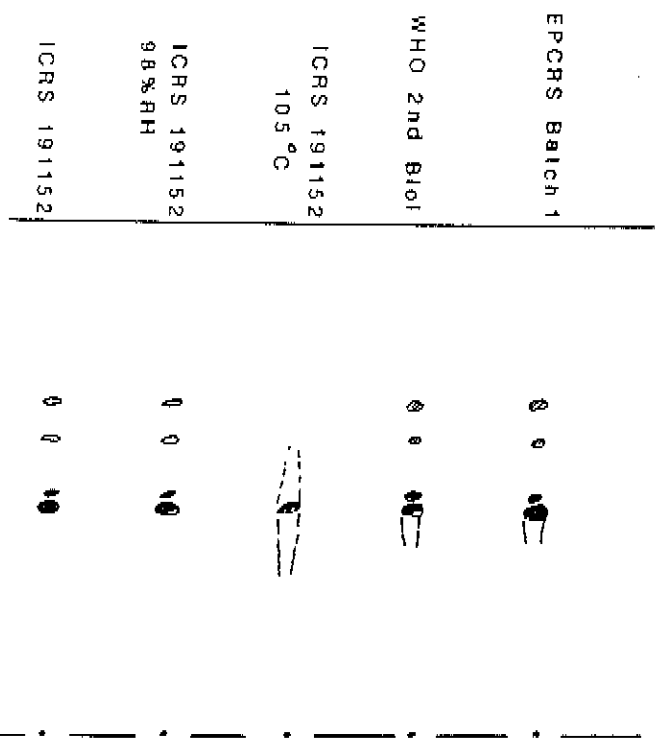
Trois taches secondaires avec Rf = 0,46, 0,57 et 0,65 ont été détectées à 304 nm dans l'ICRS 191152, de même que dans le deuxième étalon biologique OMS et l'EPCRS.

Rf (nystatine A_1) = 0,43.

Une importante dégradation a été observée dans l'échantillon soumis à la chaleur. A 304 nm, l'ICRS 191152 s'est montré la substance la plus pure.

Les résultats sont donnés à la Figure 4.

FIGURE 4. CHROMATOGRAMMES EN COUCHE MINCE POUR LA NYSTATINE



D. Spectrophotométrie UV

Les échantillons ont également été analysés par une méthode simple de spectrophotométrie UV. Ils ont été dissous dans le méthanol et la densité optique a été mesurée à 304 nm.

Les résultats sont donnés au Tableau 5.

TABLEAU 5

Substance	Teneur, exprimée en % de l'ICRS
ICRS 191152	100,0
2e étalon biologique OMS	97,1
EPCRS lot 1	86,4
ICRS 191152, 98 % HR 14 jours, 20°C	94,9
ICRS 191152, 105°C 24 heures	63,0
ICRS 191152, lumière du jour 18 jours, 20°C	-

(- échantillon non disponible).

Même cette méthode non sélective donne une indication de la stabilité.

E. Analyse thermogravimétrique

Les substances étudiées ont été chauffées à 140°C. Les résultats de la perte de poids calculée pour 120°C sont donnés au Tableau 6.

Appareil : Analyseur thermogravimétrique Perkin Elmer TGA 7.

Poids de l'échantillon : 4 mg.

Chauffage : 5°C/min.

Température de décomposition : environ 160°C.

TABLEAU 6

Substance	Perte de poids, %
ICRS 191152	5,2
2e étalon biologique OMS	4,8
EPCRS lot 1	4,8
ICRS 191152, 98 % HR 14 jours, 20°C	7,3
ICRS 191152, 105°C 20 heures	4,7
ICRS 191152, lumière du jour 18 jours, 20°C	5,9

La substance est hygroscopique lorsqu'elle est exposée à une forte humidité (98 %) ou qu'elle est conservée à la lumière du jour dans un récipient ouvert.

Tableau récapitulatif

TABLEAU 7

Substance	HPLC, exprimé en % de l'ICRS	% impuretés, exprimé en aire %	Titrage microbiologique		UV 304 nm	TG % perte de poids
			UI/mg	% de l'ICRS		
ICRS 191152	100,0	7,9	4968	100,0	100,0	5,2
2e étalon biologique OMS	86,5	12,1	teneur déclarée 4855	97,7	97,1	4,8
EPCRS lot 1	79,3	11,1	4221 (teneur déclarée 4980)	85,0	86,4	4,8
ICRS 191152, 98 % HR 14 jours, 20°C	95,9	7,9	4605	92,7	94,9	7,3
ICRS 191152, 105°C 20 heures	40,8	14,9	1930	38,8	63,0	4,7
ICRS 191152, lumière du jour 18 jours, 20°C	88,3	10,1	4074	82,0	-	5,9

Conclusion

La concordance entre le titrage par HPLC et le titrage microbiologique est acceptable, à l'exception du deuxième étalon biologique OMS qui présente une forte activité microbiologique, tout en étant chimiquement de plus faible qualité que l'ICRS. On peut avancer comme explication que l'impureté qui s'élue tardivement (voir Figure 2) à 33 min, qui domine dans l'étalon biologique, possède une activité microbiologique analogue à celle de la nystatine A_1. Nous tenterons de l'identifier par CL-SM.

Il n'existe pas d'accord parfait entre les valeurs du titrage HPLC et la quantité d'impuretés trouvée. Cela peut être dû au fait que nous avons dû utiliser la mesure de l'aire des pics pour évaluer la teneur en impuretés, pour lesquelles il n'existe pas de substance de référence. Toutefois, la plus forte quantité d'impuretés a été trouvée dans l'échantillon le plus dégradé.

Il faut également noter que les données de mesures simples en spectrophotométrie UV à 304 nm ont montré des résultats concordant remarquablement avec ceux des autres méthodes.

SUBSTANCES CHIMIQUES INTERNATIONALES DE REFERENCE LISTE PREVISIONNELLE POUR 1994

Les substances chimiques internationales de référence ci-après sont nécessaires pour accompagner les spécifications qui figurent dans la troisième édition de la *Pharmacopée internationale* :

Volume 3

Calcium, folinate (*)
Doxorubicine, chlorhydrate
Fludrocortisone, acétate
Gentamicine, sulfate (*)
Hydrocortisone, succinate sodique (*)
Lévonorgestrel (*)
Lopéramide, chlorhydrate (*)
Méthotrexate (*)
Nifurtimox
Noroxymorphone, chlorhydrate (*)
(impureté du chlorhydrate de naloxone)
Paromomycine, sulfate
Praziquantel
Prednisolone, phosphate sodique
Sulfacétamide
Testostérone, énantate (*)

(*) Indique que des travaux sont en cours au Centre sur cette substance.

Volume 4

Amidotrizoïque, acide
3-Amino-2,4,6-triiodobenzoïque, acide
Bétaméthasone, phosphate sodique
Chloroquine, sulfate
Cisplatine
Dactinomycine
Ephédrine, sulfate
Flucloxacilline sodique
Iohexol
Iopanoïque, acide
Iotroxique, acide
Kanamycine, monosulfate
Kétamine, chlorhydrate
Mébendazole
Médroxyprogestérone, acétate
Néomycine, sulfate
Niclosamide
Nitrofurantoïne
Noréthistérone, énantate
Paracétamol
Pentamidine, isétionate
Pipérazine, adipate
Pipérazine, citrate
Prednisolone, phosphate sodique
Prednisolone, succinate
Primaquine, diphosphate
Pyrazinamide
Sodium, amidotrizoate
Streptomycine, sulfate
Tamoxifène, citrate
Tamoxifène, citrate, isomère-E
Thiopental sodique
Timolol, maléate
Toluène-2-sulfamide
Vinblastine, sulfate

APPENDIX 9

4-EPITETRACYCLINE HYDROCHLORIDE

Control No 293098

Analytical Report

INTENDED USE

The stock of the current batch of the International Chemical Reference Substance of 4-epitetracycline ammonium salt, Control No 180098, is depleted and has to be replaced.

The monograph for Tetracycline hydrochloride in the International Pharmacopoeia 3rd Ed. Vol 2 requires the use of a reference substance of 4-epitetracycline hydrochloride in the thin-layer chromatographic test for related substances.

MATERIAL

About 5 g of the sample were received at the WHO Centre in December 1993. The material is being stored in tightly closed containers at + 5 °C, protected from light. This ICRS is from the same batch as the Ph Eur CRS Batch 3.

ANALYTICAL DATA

Description: A yellow powder.

EVIDENCE OF CHEMICAL STRUCTURE

Infrared spectrum

An infrared spectrum of 4-epitetracycline hydrochloride is given in Figure 1 (No W 293098 A). The spectrum is concordant with the spectrum of the USP reference standard lot F.

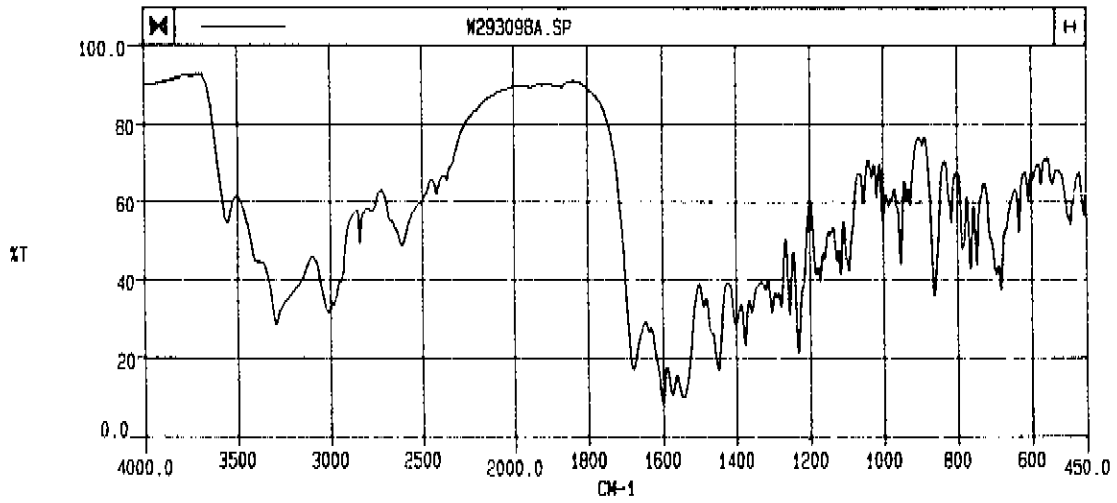


Figure 1. *IR-spectrum of 1.1 mg of 4-epitetracycline hydrochloride Control No 293098 in 300 mg KBr recorded against a KBr disc.*
Instrument: Perkin -Elmer 1600 FTIR.

UV-spectrum

A UV-spectrum in 0.01 M HCl is given in Figure 2. UV-maxima are observed at 218 nm, 256 nm and 358 nm.

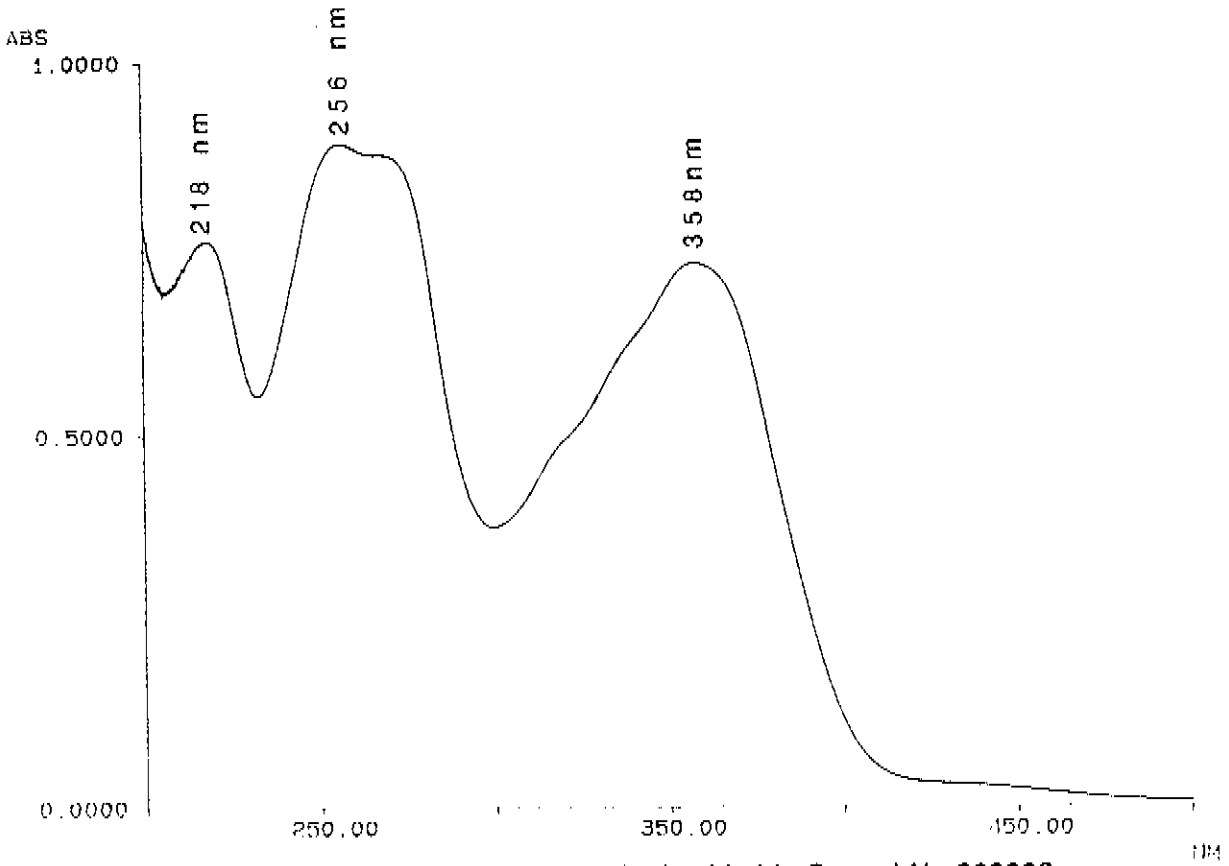


Figure 2. *UV-spectrum of 4-epitetracycline hydrochloride Control No 293098.*

HPLC identity test: The main peak obtained with 4-epitetracycline hydrochloride Control No 293098 in the chromatographic system used under assay and purity corresponds in retention time to that obtained with the USP reference standard Lot F.

ASSAY

Liquid chromatographic assay: 93.3% (n = 6, RSD = 1.8%) when determined against the USP reference standard for 4-epitetracycline hydrochloride Lot F, regarded as 100%. The chromatographic system used was the same as described under purity, except for the eluent that was changed to 80 /20 (buffer:acetonitrile). The calculations were performed on the dried substances.

When assayed against the old ICRS for 4-epitetracycline NH_4-salt, 180098, regarded as 100%, the content was estimated to be 92.2%.

Spectrophotometric assay: 94.9% (n = 2) when determined in 0.01 M HCl at 218 and 256 nm against the USP reference standard for 4-epitetracycline Lot F, regarded as 100%. The calculations were performed on the dried substances.

Thermogravimetric analysis: When the substance was heated to 105 °C for 16 hours a loss of weight of 4.7% was observed.

Instrument:	Perkin Elmer TGA 7 Thermogravimetric analyzer.
Sample weight:	about 2 mg
Heating rate:	multiramp, 0.2 °C/min
Melting point:	about 120 °C with decomposition

As the values from the Karl Fischer titration differ between manufacturer and collaborating laboratories, we rely more on the thermogravimetric analysis, which was performed with multiramp technique for 16 hours. Water and solvents are codetermined with thermogravimetric analysis.

PURITY

High performance liquid chromatography

The total amount of impurities was estimated by using external standards for tetracycline and 4-epianhydrotetracycline hydrochloride to be 6.2%. The peak eluting at 7.4 minutes was identified as tetracycline present at 0.3% when the corresponding reference substance was used. The peak eluting at 46.4 minutes was identified as 4-epianhydrotetracycline, present at 5.9% when the corresponding reference substance was used. Peak area normalisation gave far too high values for 4-epianhydrotetracycline (about 12%) due to differences in molar absorptivity. Anhydrotetracycline hydrochloride which was eluted when the amount of acetonitrile was increased to 18% was not found in the ICRS.

A chromatogram is shown in Figure 3.

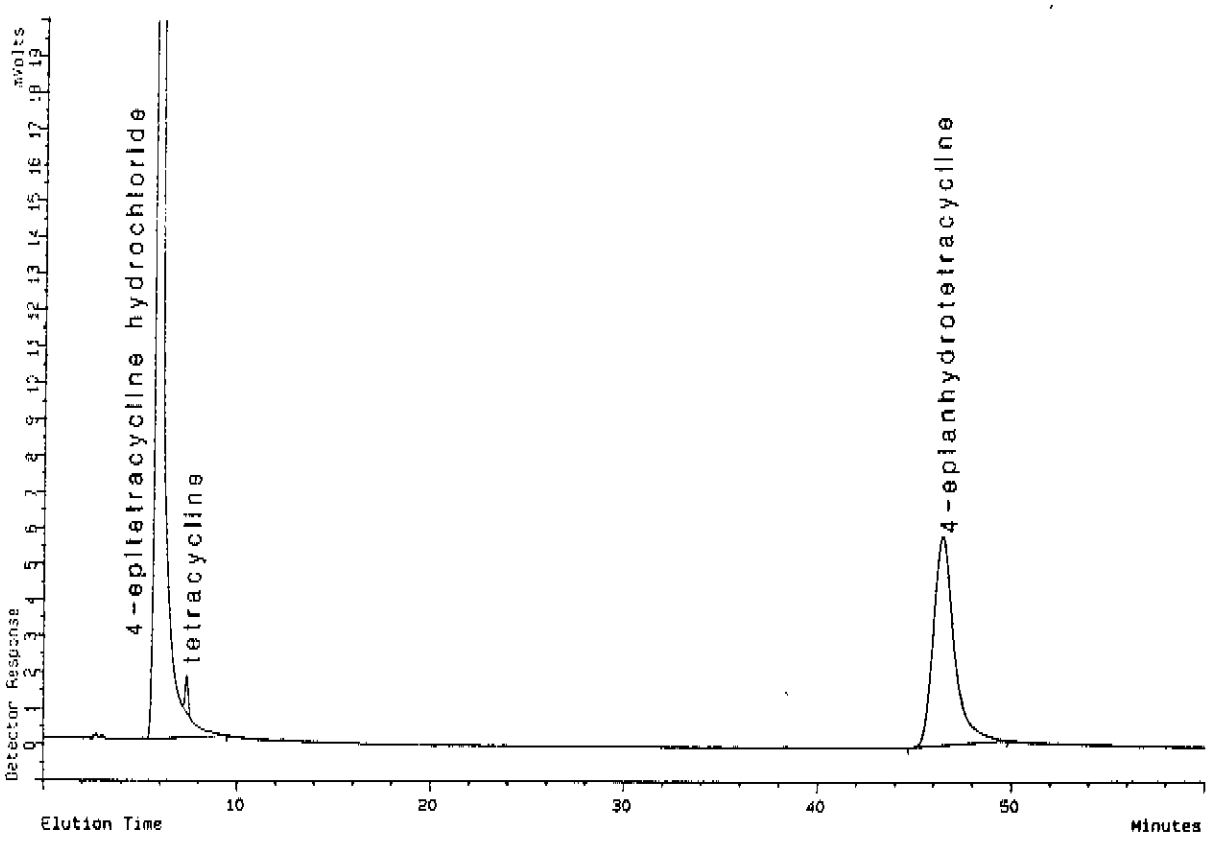


Figure 3. *Chromatogram of 4-epitetracycline hydrochloride, Control No 293098.*

The following conditions were used:

Eluent: 0.1M sodium phosphate buffer pH 2.4:Acetonitrile (85:15)

Column: Vydac C18, 218 TP54

Detector: Varian 100 operated at 271 nm.
Pump: Varian 5500

Integrator: PeakPro (Beckman)

Sample: 0.5 mg/ml dissolved in the eluent.The sample must be freshly prepared.
20 µl corresponding to 10 µg were injected.

DATA GIVEN BY THE MANUFACTURER

Description: Yellow powder
Identification: IR spectrum attached
Identification: Sulphuric acid gives a violet colour, by addition of water it becomes yellow.
Identification: Chlorides positive reaction
HPLC: 4% impurities (tetracycline and 4-epianhydrotetracycline)
Water by KF: 3.4% (n = 4, RSD = 3.9%)
Assay (non-aqueous titration): 102.9% (n = 4, RSD = 0.6%). High titration value is due to the presence of some ammonium chloride.

DATA GIVEN BY COLLABORATING LABORATORIES

EPCRS Batch 3, results from 1993.
Description: Yellow powder
Identification: IR complies with CRS 1
TLC: Complies with CRS 1
Water by KF: 2.4% (n = 2)

STABILITY

Stability studies were not performed as it was considered that this substance, based on the experience of the previous lot, was stable and showed no signs of degradation when stored for 12 years at +5 °C. Regular re-examinations of the ICRS will be performed.

CONCLUSION

4-Epitetracycline hydrochloride, Control No 293098, can be considered suitable as International Chemical Reference Substance for the intended purpose.

APPENDIX 10

(–)-3-(4-HYDROXY-3-METHOXYPHENYL)-2-HYDRAZINO-2-METHYLALANINE (3-O-METHYLCARBIDOPA)

Control No 193180

Analytical Report

INTENDED USE

The monograph for Carbidopa in the International Pharmacopoeia 3rd Ed. Vol 3 requires a reference substance for 3-O-methylcarbidopa to be used for a liquid chromatographic purity determination.

MATERIAL

About 5 g of the sample (manufacturers batch no L-588,581-000H006) were received at the WHO Centre in November 1992. The material is being stored in tightly closed containers at + 5 °C, protected from light.

ANALYTICAL DATA

Description: A white to pale yellow, crystalline powder.

EVIDENCE OF CHEMICAL STRUCTURE

Infrared spectrum

An infrared spectrum is given in Figure 1 (No 193180). The spectrum is concordant with the spectrum of the Ph Eur CRS Batch 1 for methylcarbidopa.

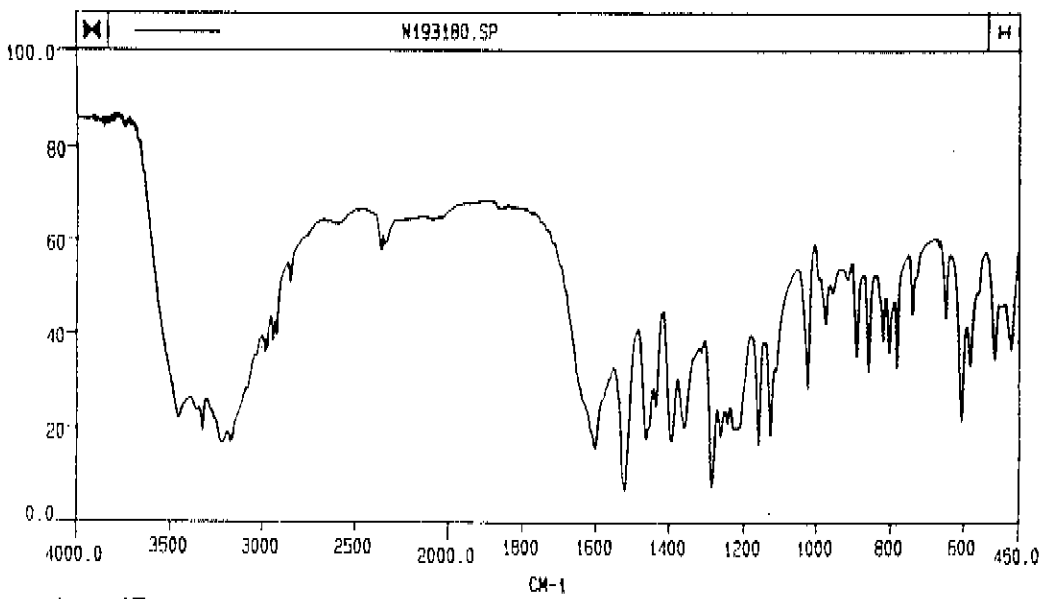


Figure 1. *IR-spectrum of 1.1 mg of 3-O-methylcarbidopa Control No 193180 in 300 mg KBr recorded against a KBr disc.*
Instrument: Perkin-Elmer 1600 FTIR.

UV-spectrum: See under diode array.

HPLC: The ICRS showed the same retention time as the Ph Eur CRS lot 1 for methylcarbidopa in the chromatographic system described under purity.

ASSAY

Thermogravimetric analysis: When the substance was heated to 160 °C a loss of 3.5% of weight was observed.

Instrument: Perkin Elmer TGA 7 Thermogravimetric analyzer.
Sample weight: 3 mg
Heating rate: 5 °C /min
Melting point: about 200 °C

PURITY

High performance liquid chromatography

About 1% impurities were found (n = 9, RSD = 0.2%). The same result was observed at 210 nm and 282 nm. Two impurities were detected. Impurity 1 eluting at 5.5 minutes was estimated to about 0.3% by peak area normalization. It was shown to be carbidopa and estimated using an external standard at about 0.4%. Impurity 2 eluting at 8.6 minutes was estimated to be about 0.7% by peak area normalisation and identified as 3-O-methylmethyldopa when compared to ICRS 179085 and by using an external standard of 3-O-methylmethyldopa it was estimated to be about 0.8%. Methyldopa with a retention time of 4.4 minutes was not detected in the sample.

A chromatogram is shown in Figure 2.

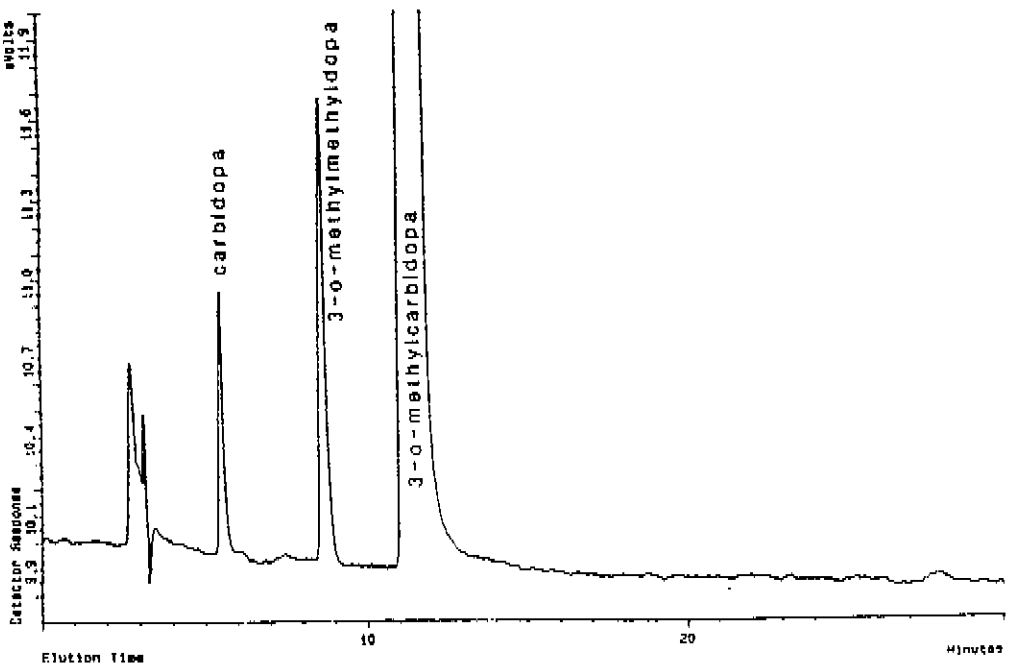


Figure 2. *Chromatogram of 3-O-methylcarbidopa Control No 193 180 monitored at 282 nm.*

The following conditions, which is a modified version of the system described in Ph Int, were used:

Eluent: Methanol: 0.1 M NaH_2PO_4 buffer pH = 2.9 (15:85)

Column: Chromasil 100 C8, 5 µm (HiChrom)

Detector: Varian 9065 Polychrom at 282 nm and 210 nm.

Pump: Varian 9012 operated at a flow rate of 1.0 ml/min.

Integrator: PeakPro (Beckman)

Sample: 0.9 mg/ml dissolved in the eluent. No degradation was found in a sample stored for 24 hours in the eluent.
20 µl corresponding to 18 µg were injected.

The detection limit for 3-O-methylcarbidopa was 0.001 mg/ml (0.05%).

The Ph Eur CRS lot 1 of methylcarbidopa was also shown to contain about 1% impurities, with a similar impurity pattern as the ICRS.

Diode-array detection

The chromatographic system described above was also evaluated with a Varian 9065 Polychrom detector. UV-maxima for 3-O-methylcarbidopa were found to be at 200 nm, 224 nm and 278 nm when recorded in the eluent. UV maxima for the two impurities were at 195 nm and 283 nm for carbidopa and at 195 nm, 224 nm and 278 nm for 3-O-methylmethyldopa. The UV-spectrum of 3-O-methyl-carbidopa in the eluent is given in Figure 3.

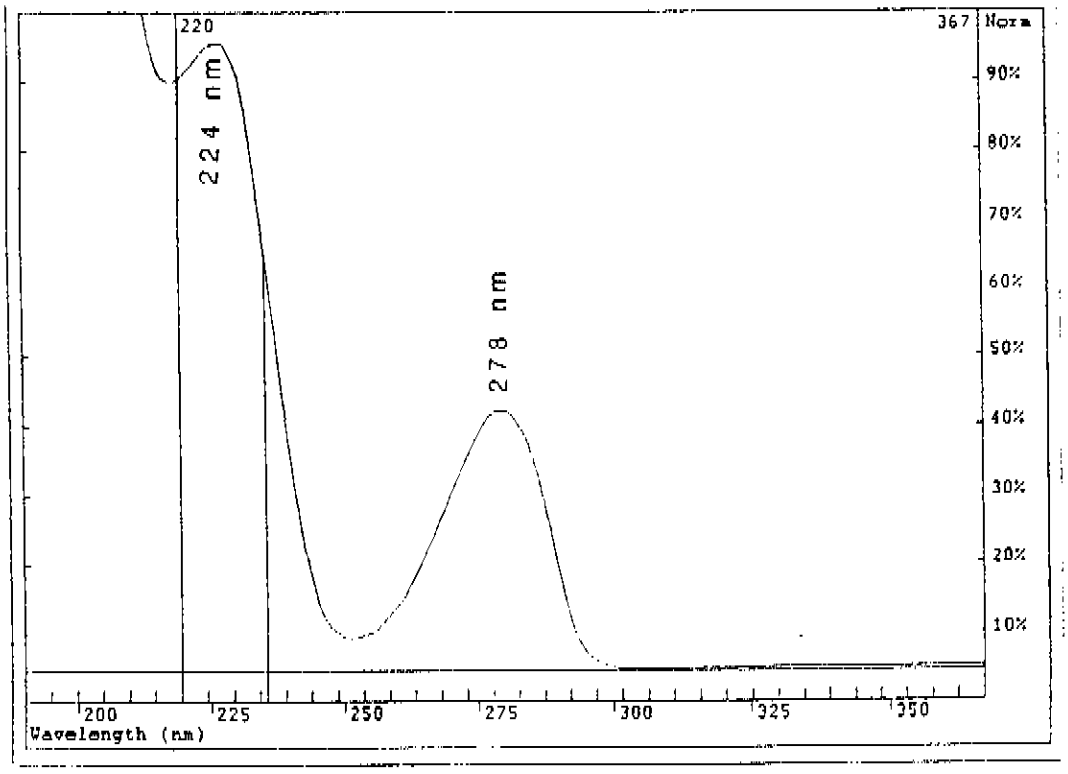


Figure 3. *UV-spectra for 3-O-methylcarbidopa recorded by the diode array detector.*

DATA GIVEN BY THE MANUFACTURER

Infrared spectrum: conforms
UV: *A* (1%, 1 cm) = 123 at 282 nm.
A (1%, 1 cm) = 285 at 232 nm.
Loss on drying: 3.8%
Liquid chromatography: 99.3%

STABILITY

Stability studies were not performed as this substance was not suspected to degrade easily. Regular re-examinations of the ICRS will be performed.

CONCLUSION

(–)-3-(4-Hydroxy-3-methoxyphenyl)-2-hydrazino-2-methylalanine (3-O-methylcarbidopa), Control No 193180, can be considered suitable as International Chemical Reference Substance for the intended purpose.

APPENDIX 11

LIOTHYRONINE SODIUM

Control No 193179

Analytical Report

INTENDED USE

The monograph for Levothyroxine sodium in the International Pharmacopoeia 3rd Ed. Vol 3 requires a reference substance of liothyronine sodium to be used in the thin-layer chromatographic test for liothyronine.

MATERIAL

About 25 g of the sample (manufacturers batch no 395/z) were received at the WHO Centre in June 1993. The material is being stored in tightly closed containers at + 5 °C, protected from light.

ANALYTICAL DATA

Description: Almost white slightly brownish coloured powder.

EVIDENCE OF CHEMICAL STRUCTURE

Infrared spectrum

The infrared spectrum is given in Figure 1 (No 193179 A). The spectrum is concordant with the spectrum of Ph Eur CRS batch 2 of liothyronine sodium.

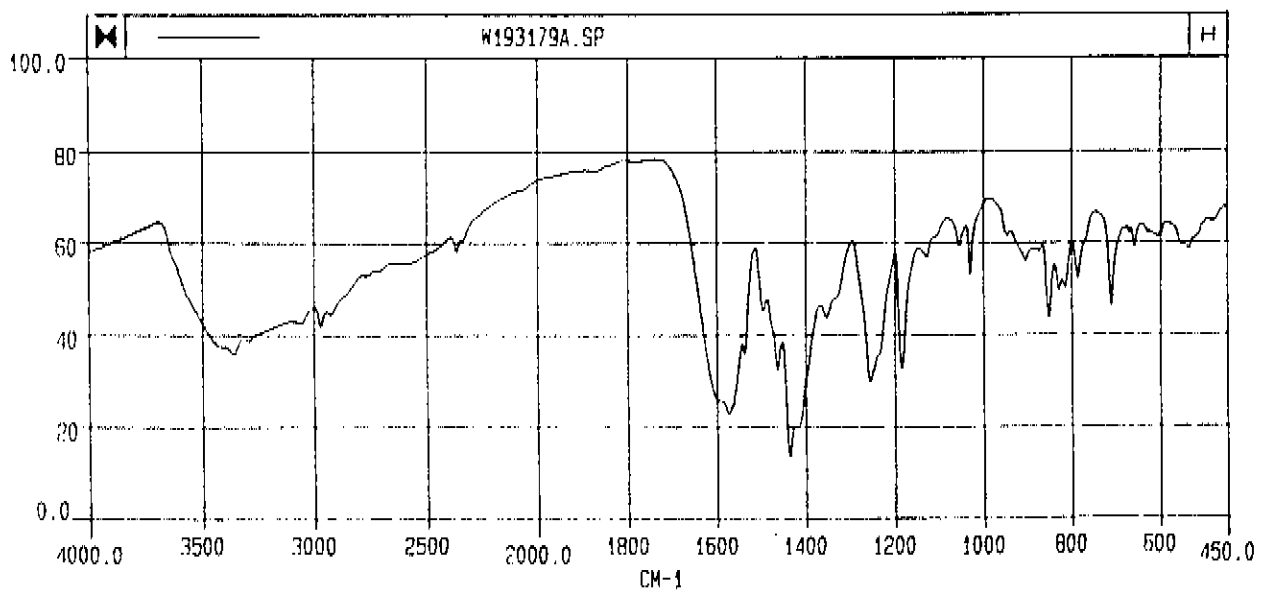


Figure 1. *IR-spectrum of 1.9 mg of liothyronine sodium Control No 193179 in 300 mg KBr recorded against a KBr disc.*
Instrument: Perkin-Elmer 1600 FTIR.

UV-spectrum: See below under diode array.

Sodium: 4.3%, determined by atomic adsorption spectroscopy.

Specific optical rotation: + 21.0° determined on the dried substance according to BP (limits +18.0° to +22.0°)

ASSAY

Assay: See data given by the manufacturer.

Thermogravimetric analysis: When the substance was heated to 105 °C for 2 hours a loss of weight of 3.5% was observed.

Instrument: Perkin Elmer TGA 7 Thermogravimetric analyzer.
Sample weight: 6 mg
Heating rate: multiramp
Melting point: about 236 °C with decomposition.

Loss on drying: 3.0%, when dried to constant weight at 105 °C.

Water: 2.6%, determined by Karl Fischer titration.

PURITY

Thin-layer chromatography

The total amount of impurities present was estimated to be approximately 1%.
The following thin-layer chromatographic system according to the International Pharmacopoeia 3rd Ed. Vol 3 was used.

Thin-layer: Silica gel 60 F-254 (Merck).

Eluent: Ammonia conc: 2-propanol: ethylacetate (20:35:55)

Sample: 100 µg were applied. The sample was dissolved in methanol:ammonia (14:1).

Visualization: Evaluation under UV-light of 254 nm and scanning by densitometry at 225 nm with a Desaga CD 60 Scanner. Spraying with ferric dichloride -ferricyanide -arsenite solution and visualization in day-light.

Four secondary spots were detected visually at 254 nm. When evaluated by densitometry four secondary spots were detected and estimated to be about 1%. One of the impurities was identical to levothyroxine, it was estimated to be present at approximately 0.3%. The detection limit of the system was about 0.2 µg (0.2%) at 225 nm. After spraying the same four secondary spots were detected.

Rf (liothyronine sodium) = 0.13
Rf (levothyroxine sodium) = 0.11

In the Ph Eur CRS batch 2 approximately 5% impurities were detected. The amount of impurities found in the USP reference standard Lot I was approximately 0.5%.

High performance liquid chromatography

The total amount of impurities present was estimated by peak area normalisation to be 0.8%. The peak eluting at 12.5-13 minutes was identified as levothyroxine and estimated at 0.2% both by peak area normalisation and by external standard measurement.

A chromatogram is shown in Figure 2.

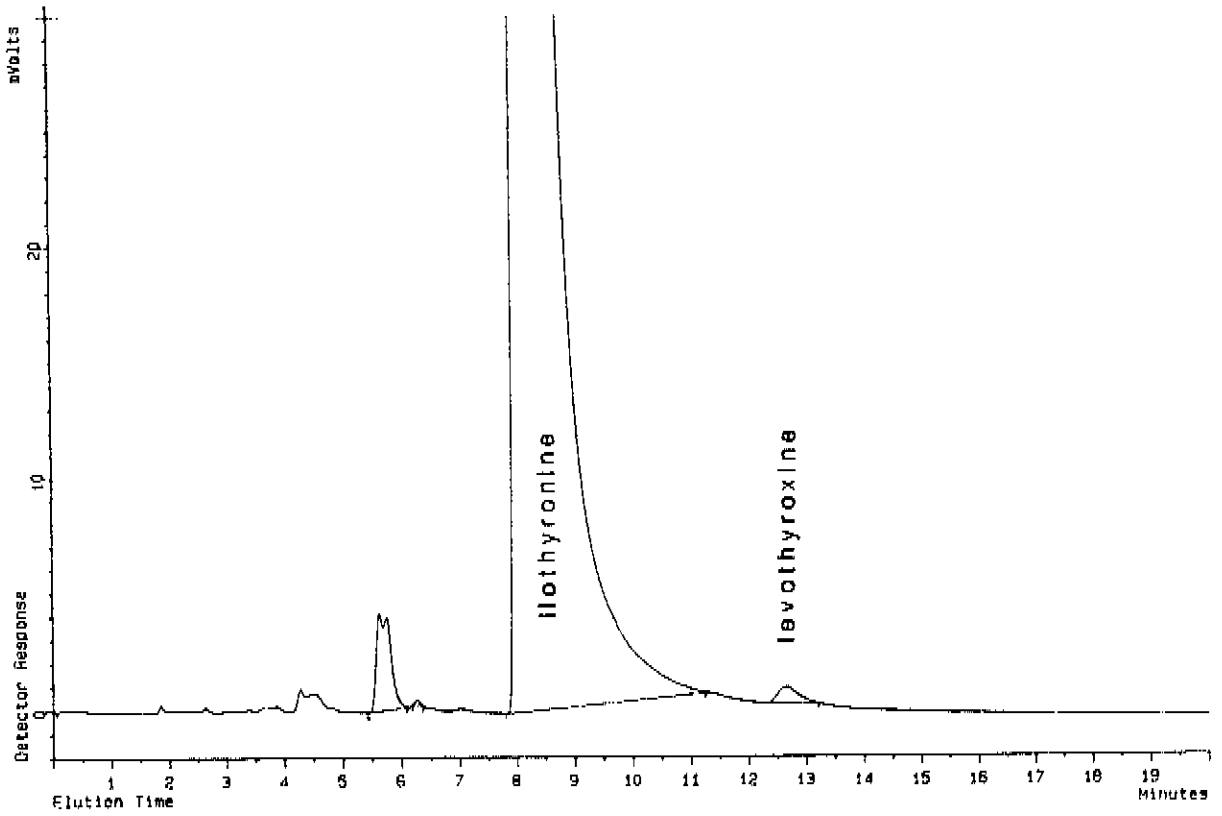


Figure 2. *Chromatogram of liothyronine sodium Control No 193179.*

The following conditions were used:

Eluent: Acetonitrile:water containing 0.02 M sodium dodecylsulfate and 0.02 M H_3PO_4 (55:45)

Column: Spheri- 5 OD-5A RP 18 (Brownlee)

Detector: Varian UV-100 at 225 nm

Pump: Varian 5500 operated at 1ml/min

Integrator: PeakPro (Beckman)

Sample: 1 mg/ml dissolved in the eluent. The sample must be freshly prepared.
20 µl corresponding to 20 µg were injected.

Liothyronine USP reference substance and the Ph Eur CRS batch 2 were also tested and about 0.5% impurities and 5% impurities were found respectively.

Diode-array detection

The chromatographic system described above was also evaluated with a Varian 9065 Polychrom detector. The same chromatographic system as described above was used. UV-maxima were recorded for liothyronine and four extra peaks. UV-maximum were found to be at 224 nm for all investigated peaks. A UV-spectrum in the eluent is given for the liothyronine peak in Figure 3.

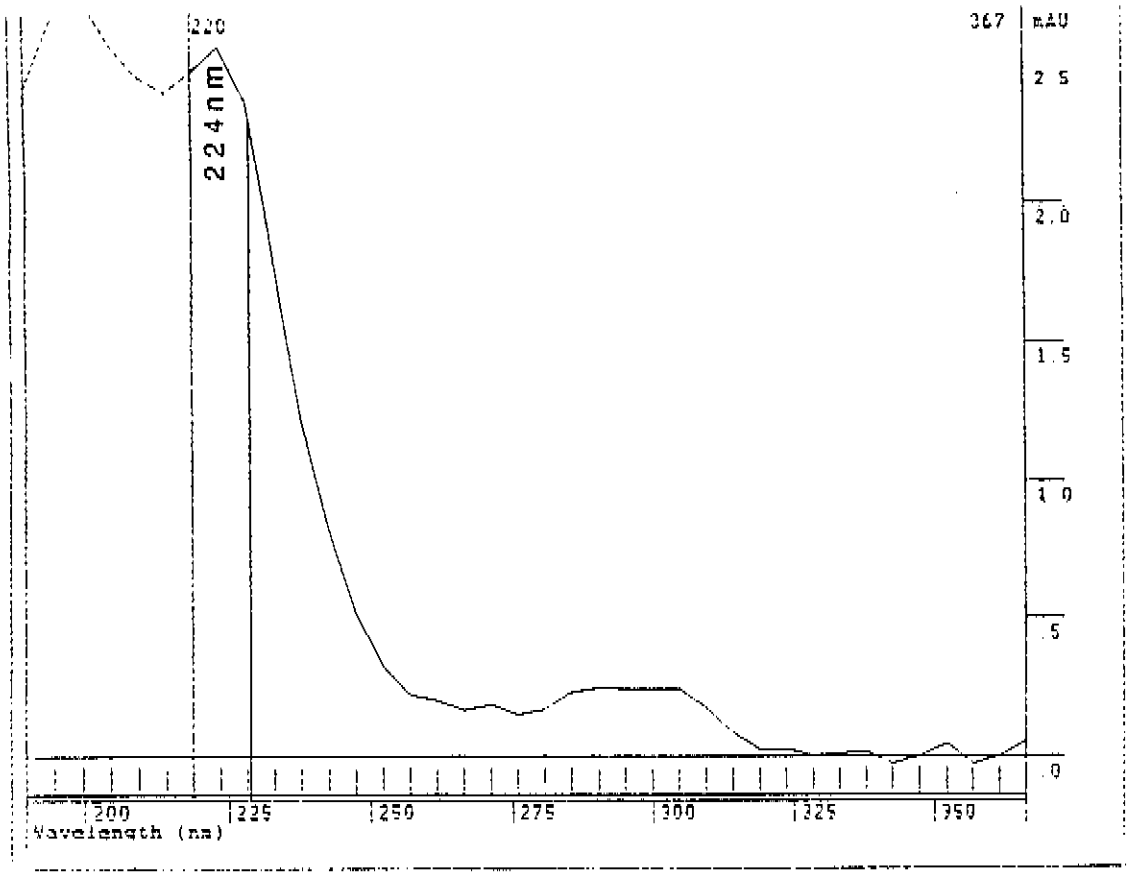


Figure 3. *UV-spectrum for liothyronine recorded by the diode array detector.*

DATA GIVEN BY THE MANUFACTURER

There is no monograph for Liothyronine sodium in the International Pharmacopoeia. Limits from USP and BP are given.

Description: Cream powder
Identification: Conforms
Loss on drying: 3.1% (limits <4%, USP, BP)
Specific rotation: + 21.9° (limits +18.0° - +22.0°, USP, BP)
Assay: 96.9%
Sodium: 3.2% (limits 2.9 - 4.0%, USP)
L-diiodothyronine sodium: < 0.5%
L-thyroxine sodium: < 2% (limits <2%, BP, <5% USP)
Chloride: < 0.02%
Inorganic iodide: <0.08%
Heavy metals: < 20 ppm
Colour of solution: pass test

STABILITY

Stability studies were not performed as this substance was not suspected to degrade easily. Regular reexaminations of the ICRS will be performed.

CONCLUSION

Liothyronine sodium, Control No 193179, can be considered suitable as International Chemical Reference Substance for the intended purpose.

APPENDIX 12

NEAMINE HYDROCHLORIDE
(NEOMYCIN A)
Control No 193177

Analytical Report

INTENDED USE

The monograph for Neomycin sulfate in the International Pharmacopoeia 3rd Ed. Vol 3 requires a reference substance for neamine to be used in the thin-layer chromatographic test for neamine.

MATERIAL

About 50 mg of the sample (Ph Eur CRS Lot 1) were received at the WHO Centre in October 1987. The material is being stored in tightly closed ampoules at + 5 °C, protected from light.

No other reference material of neamine is available which limits the number of tests that can be performed.

ANALYTICAL DATA

Description: A fluffy white powder.

EVIDENCE OF CHEMICAL STRUCTURE

Infrared spectrum

An infrared spectrum is given in Figure 1, No W 193177 A.

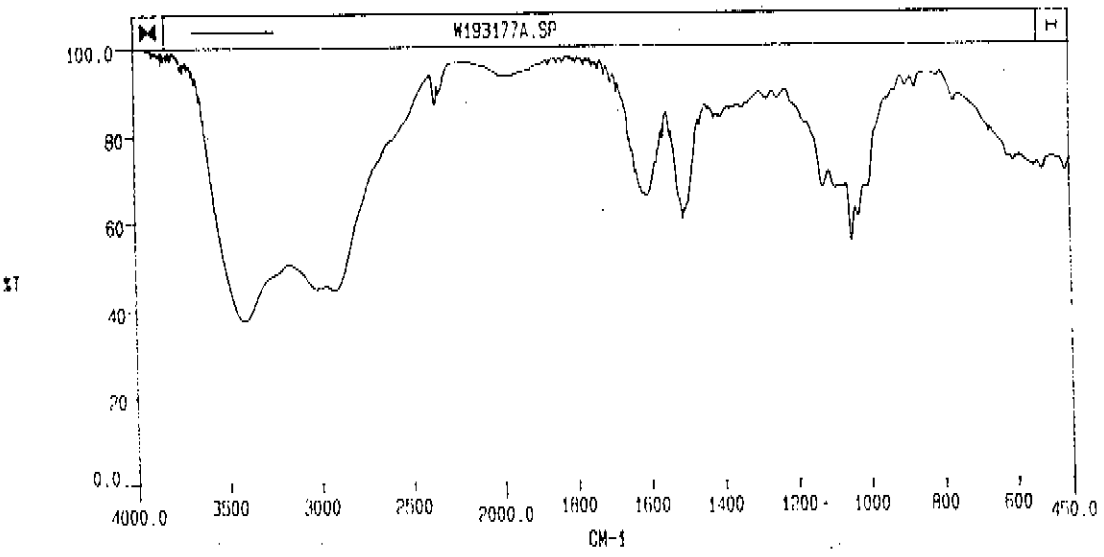


Figure 1. *IR-spectrum of 0.4 mg of neamine hydrochloride Control No 193177 in 300 mg KBr recorded against a KBr disc.*
Instrument: Perkin-Elmer 1600 FTIR.

UV-spectrum

There was no significant absorbance of a 0.07 mg/ml solution in water in the range 200 nm to 500 nm. *A* (1%, 1 cm) = 30 at 200 nm.

LC-MS: A spectrum was recorded by electrospray LC-MS for the main peak (neamine). The molecular weight obtained 322.3 supports the structure for neamine. The cromatographic system used was a Brownlee RP18 column, and an eluent consisting of 10% Methanol and 90% buffer containing 0.11 M TFA, with pH adjusted to 3.6 with NH_4OH.

NMR: ^{1}H-NMR spectrum was recorded in D_2O, it supports the structure for neamine.

Chlorides: Positive identity test, accordning to Ph Eur.

ASSAY

Thermogravimetric analysis: When the substance was heated to 140 °C a loss of 8.6% of weight was observed.

Instrument:	Perkin Elmer TGA 7 Thermogravimetric analyzer.
Sample weight:	0.5 mg
Heating rate:	2 °C/min

PURITY

Thin-layer chromatography

Two different chromatographic systems were tested.

System 1

The following thin-layer chromatographic system according to the International Pharmacopoeia 3rd Ed. Vol 3 described under identity test was used.

Thin-layer:	Silica gel 60 F-254, HPTLC (Merck)
Eluent:	40g ammonium acetate /l in water, freshly prepared.
Sample:	40 µg of neomycin B sulfate and 0.5 and 1 µg of neamine hydrochloride dissolved in water were applied.
Visualization:	Spraying with ninhydrin, 0.1 g /100ml butanol.

No separation of neomycin B sulfate and neamine was observed. All spots were retained at the application spot.

System 2

The following thin-layer chromatographic system according to the International Pharmacopoeia 3rd Ed. Vol 3 described under test for neamine test was used.

Thin-layer:	Laboratory made silica gel H, carbomer pH 7, layer thickness 0.75 mm.
Eluent:	100 g potassium dihydrogen phosphate / l in water.
Sample:	25 and 50 µg of neomycin B sulfate and 0.2,0.5 and 1 µg of neamine hydrochloride dissolved in water were applied.
Visualization:	Spraying with ninhydrin + stannous chloride according to Ph.Int.

No neamine was found in the neomycin B sulfate ICRS, which means less than 1%. (0.5 µg of neamine).

The spot obtained for neomycin B exhibited tailing.

Rf (neomycin B sulfate) = 0.35
Rf (neamine) = 0.42

High performance liquid chromatography

As neomycin and neamine has practically no UV -absorbance other detection principles was investigated. Electrochemical detection gave insufficent response but a pre-column derivatization step with 2,4-dinitrofluorobenzene, based on the method in USP XXII, ninth supplement for tobramycin, proved to be satisfactory.

Three unknown impurities were found, estimated to be about 4% by peak area normalisation. Lack of reference materials of the corresponding impurities precluded the study of their behaviour in the derivatization step.

A chromatogram is shown in Figure 2.

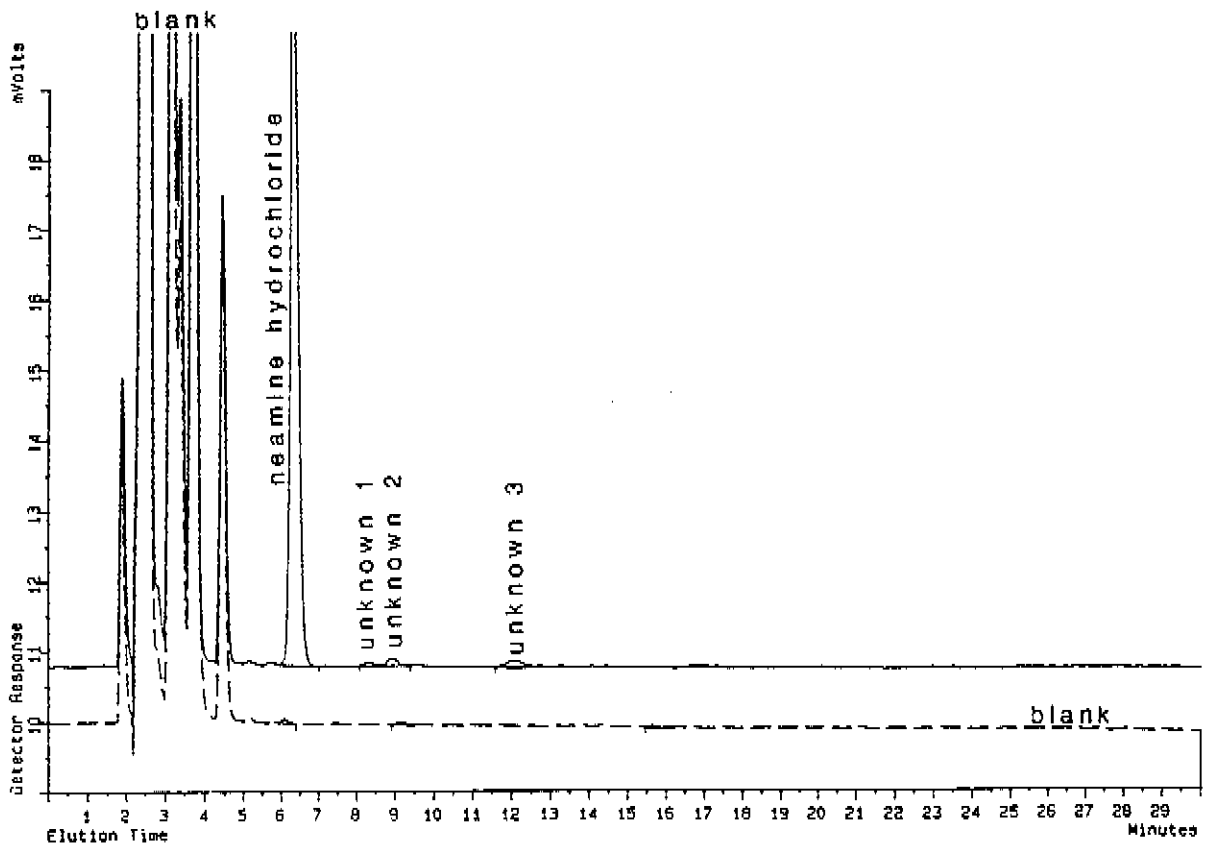


Figure 2. *Chromatogram of neamine Control No 193177 as 2,4-dinitrofluorobenzene derivative monitored at 367 nm. (Eluent 65/35)*

The following conditions were used:

Eluent: Acetonitrile: buffer, pH 2.6, consisting of 2 g tris (hydroxymethyl)aminomethane and 10 ml 1 M sulfuric acid dissolved in water and diluted to 1000 ml (65/35)

Column: Brownlee Labs RP -18 OD -5A at 40 °C.

Detector: Varian 9065 Polychrom operated at 367 nm.

Pump: Varian 9010 operated at a flow rate of 1 ml/min.

Integrator: PeakPro (Beckman)

Derivatization reagents:

2,4-dinitrofluorobenzene reagent: 10 mg 2,4-dinitrofluorobenzene per ml in ethanol.
Tris (hydroxymethyl)aminomethane reagent: 20 ml of a solution containing 15 mg tris (hydroxymethyl)-aminomethane per ml in water is transferred into a 100 ml volumetric flask and diluted to volume with dimethyl sulfoxide, freshly prepared.

Derivatization: A sample solution containing 5 mg accurately weighed into a 10 ml volumetric flask is diluted to volume with water in a 25 ml volumetric flask. 2.00 ml of this sample solution is mixed with 2.00 ml of 2,4-dinitrofluorobenzene reagent and 2.00 ml of tris (hydroxymethyl)aminomethane reagent and heated for 50 minutes in a water bath at 60 °C. Allow to stand in room temperature for 10 minutes. Dilute to volume with acetonitrile.

NB dilute carefully, do not add all acetonitrile until room temperature is reached in the mixture since cooling occurs on mixing.

Sample: 20 µl of the above mentioned solution corresponding to 0.8 µg neomycin B sulfate were injected. A blank is also prepared in the same manner with 2.00 ml of water instead of sample solution.

DATA GIVEN BY COLLABORATING LABORATORIES

Ph Eur CRS Lot 1
TLC reported

STABILITY

Regular reexaminations of the ICRS will be performed.

CONCLUSION

Neamine hydrochloride, Control No 193177, can be considered suitable as International Chemical Reference Substance for the intended purpose.

APPENDIX 13

NEOMYCIN B SULFATE
(FRAMYCETIN SULFATE)
Control No 193178

Analytical Report

INTENDED USE

The monograph for Neomycin sulfate in the International Pharmacopoeia 3rd Ed. Vol 3 requires a reference substance for neomycin B sulfate to be used in the thin-layer chromatographic test for identity.

MATERIAL

About 50 g of the sample (manufacturers batch no OG 1046) were received at the WHO Centre in January 1993. The material is being stored in tightly closed containers at + 5 °C, protected from light.

ANALYTICAL DATA

Description: A white powder.

EVIDENCE OF CHEMICAL STRUCTURE

Infrared spectrum

An infrared spectrum is given in Figure 1 (No W 193178 A). The spectrum is concordant with the spectra of the USP reference standard for neomycin sulfate Lot K-3 and the International Biological 1st Reference Preparation for neomycin B (WHO, 1970). It is also concordant with the spectrum obtained from the 2nd International reference preparation for neomycin (WHO,1974). The spectrum for ICRS 193178 differs from those for neomycin C and for neamine (neomycin A) given in Analytical Profiles, Florey, Vol 8.

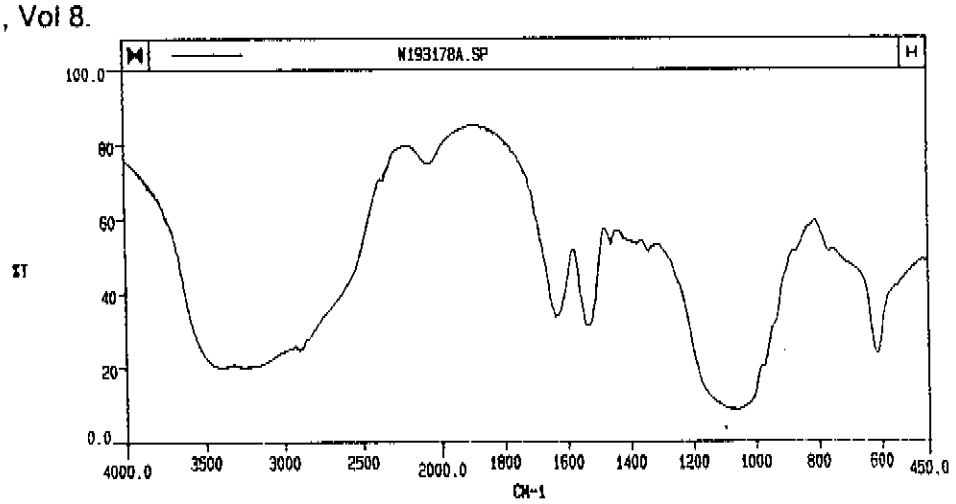


Figure 1. *IR-spectrum of 1.7mg of neomycin B sulfate Control No 193178 in 300 mg KBr recorded against a KBr disc.*

Instrument: Perkin-Elmer 1600 FTIR.

Thin-layer chromatography: See purity.

Liquid chromatography: See purity.

UV-spectrum

There was no significant absorbance of a 0.8 mg/ml solution in water in the range 200 nm to 500 nm. *A* (1%, 1 cm) = 0.14 at 228 nm.

Sulfate: 28.5% determined by ion chromatography on the dried substance.

ASSAY

Liquid chromatographic assay: Taking the proposed ICRS as 100% (n = 6, RSD = 1.3%) the calculated value for the International Biological 1st Reference Preparation for neomycin B (sulfate) was 97.8% (n = 6, RSD = 0.5%). The difference between the proposed ICRS and the biological reference preparation is statistically significant at the 95% confidence level when using the unpaired t-test. The determination was performed by the liquid chromatographic method described under purity.

Microbiological assay: 637 IU/mg "as is" with limits of error 95-105%. The International Biological 1st Reference Preparation for neomycin B(670 IU/mg "as is") was used as the standard. This correponds to 723 IU/mg when calculated on the dried substance.

Thermogravimetric analysis: When the substance was heated to 175 °C, a loss of 11.9% of weight was observed.

Instrument:	Perkin Elmer TGA 7 Thermogravimetric analyzer.
Sample weight:	6 mg
Heating rate:	2 °C/min
Melting point:	decomposes at about 180 °C

The corresponding results for WHO International Biological 1st Reference Preparation was 10.8%.

Water: 7.8% w/w (n = 3) determined by Karl Fischer titration. This method is not recommended for this type of substance.

Loss on drying: 10.8% (60 °C, reduced pressure, diphosphorus pentoxide)
11.5% (105 °C, reduced pressure, diphosphorus pentoxide)

Gaschromatography: No alcohols were detected (less than 0.1% of methanol, ethanol, propanol and butanol).

PURITY

Thin-layer chromatography

Two different chromatographic systems were employed.

System 1

The following thin-layer chromatographic system according to the International Pharmacopoeia 3rd Ed. Vol 3 described under identity test was used.

Thin-layer:	Silica gel 60 F-254, HPTLC (Merck)
Eluent:	40g ammonium acetate /l in water ,freshly prepared.
Sample:	40 µg of neomycin B sulfate dissolved in water were applied.
Visualization:	Spraying with ninhydrin, 0.1 g /100ml butanol.

No or very small migration of the spots Rf = 0 for neomycin B, neomycin C and neamine (neomycin A). To perform a reliable identification between different qualities of neomycines it is necessary to perform high performance liquid chromatography as given below.

System 2

The following thin-layer chromatographic system according to the International Pharmacopoeia 3rd Ed. Vol 3 described under test for neamine test was used.

Thin-layer:	Laboratory made silica gel H, carbomer pH 7, layer thickness 0.75 mm.
Eluent:	100g potassium dihydrogen phosphate / l in water.
Sample:	25 µg of neomycin B sulfate and 0.1 -1 µg dissolved in water were applied.
Visualization:	Spraying with ninhydrin + stannous chloride according to Ph.Int.

Neamine was not detected in the proposed ICRS of neomycin B sulfate, which means less than 1% (detection limit for neamine).
The spot obtained for neomycin B sulfate was tailing.

Rf (neomycin B sulfate) = 0.27
Rf (neamine) = 0.47
Rf (neomycin C) = 0.27

No separation between neomycin B and C is observed. To be able to distinguish between different qualities of neomycines as eg. farmycetin it is necessary to perform high performance liquid chromatography as given below.

<u>High performance liquid chromatography-determination of neamine (neomycin A) and neomycin C.</u>

As neomycin has practically no UV-absorbance other detection principles had to be chosen. Electrochemical detection was investigated but the response was too weak. Pre-column derivatization using 2,4-dinitrofluorobenzene as denoted in the monograph for tobramycin of the USP XXII, was found to be satisfactory for its detection.

0.12% of neamine (neomycin A), 1.6% of neomycin C sulfate and 0.4% of paromomycins I+II were found by peak area normalization. Neamine was determined against an external standard and was estimated to be present at 0.12%.

A chromatogram is shown in Figure 2.

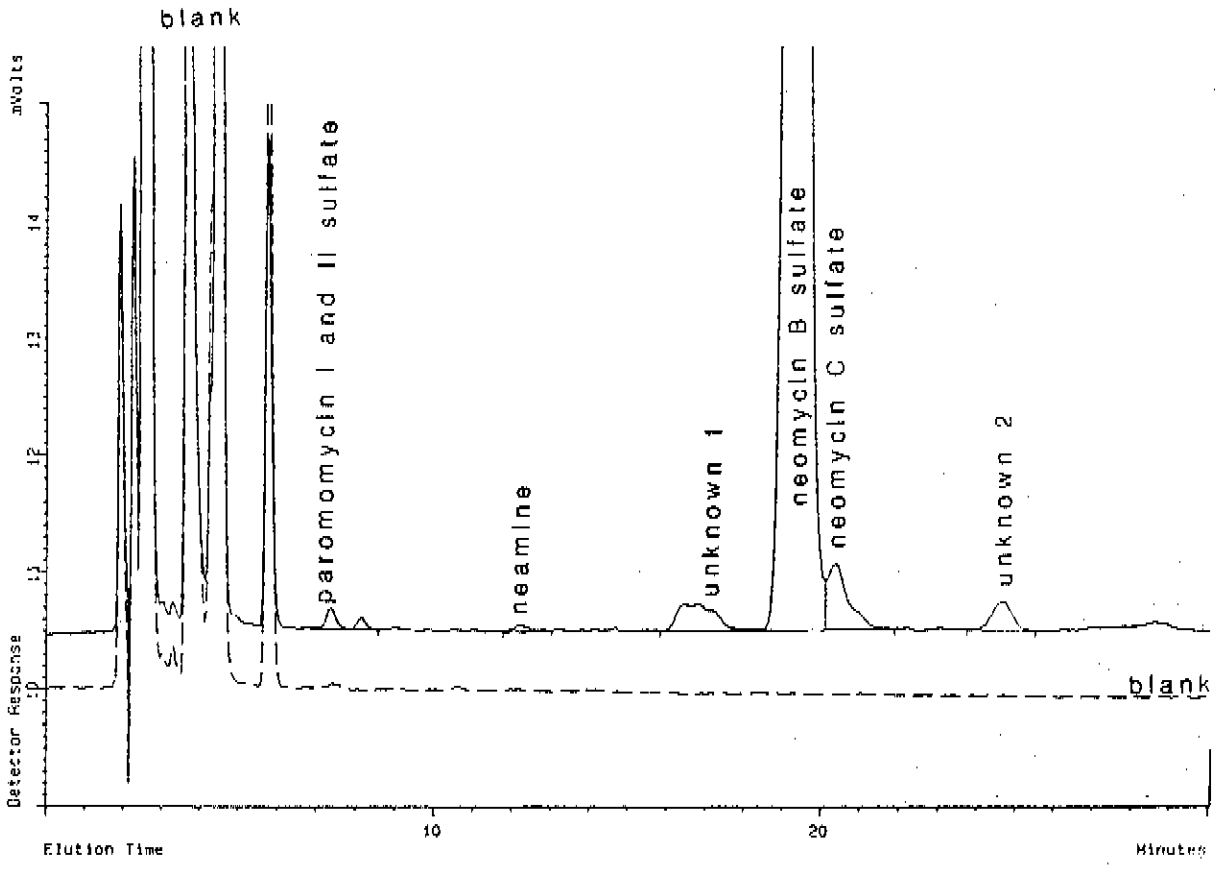


Figure 2. *Chromatogram of neomycin B sulfate Control No 193178 as 2,4-dinitrofluorobenzene derivative monitored at 367 nm. (Eluent 58:42)*

The following conditions were used:

Eluent: Acetonitrile: buffer, pH 2.6 , consisting of 2 g tris (hydroxymethyl)aminomethane and 10 ml 1 M sulfuric acid dissolved in water and diluted to 1000 ml (58:42)

Column: Brownlee Labs RP -18 OD -5A at 40 °C.

Detector: Varian 9065 Polychrom operated at 367 nm.

Pump: Varian 9010 operated at a flow rate of 1ml/min.

Integrator: PeakPro (Beckman)

Derivatization reagents:

2,4-dinitrofluorobenzene reagent: 10 mg 2,4-dinitrofluorobenzene per ml ethanol.
Tris (hydroxymethyl)aminomethane reagent: 20 ml of a solution containing 15 mg tris (hydroxymethyl) aminomethane per ml water is transferred into a 100 ml volumetric flask and diluted to volume with dimethyl sulfoxide freshly prepared.

Derivatization: A sample solution containing 5 mg accurately weighed in a 10 ml volumetric flask diluted to volume with water. In a 25 ml volumetric flask 2.00 ml of this solution is mixed with 2.00 ml of 2,4-dinitrofluorobenzene reagent and 2.00 ml of tris (hydroxymethyl)aminomethane reagent and heated for 50 minutes in a water bath at 60 °C. Allow to stand in room temperature for 10 minutes. Dilute to volume with acetonitrile.

NB: dilute carefully, do not add all acetonitrile until room temperature is reached in the mixture, since cooling occurs on mixing.

Sample: 20 µl of the above mentioned solution corresponding to 0.8 µg neomycin B sulfate were injected. A blank is also prepared in the same manner with 2.00 ml of water instead of sample solution.

A comparison of results from different neomycin B sulfate reference materials is given in Table 1.

Table 1

Reference material	neamine (neomycin A) %	neomycin C %
Neomycin B sulfate International Biological 1st Reference Preparation	0.25	traces
USP neomycin sulfate lot K-3	0.11	0.36
BPCRS Lot 1507 Framycetin sulfate	0.16	2.5
ICRS 193178 Neomycin B sulfate (framycetin sulfate)	0.12	1.6

Total "apparent" purity by liquid chromatography

In the system described above the major part of the impurities were retained on the column. In order to elute them the eluent was changed as follows.

Eluent: Acetonitrile: buffer, pH 2.6, consisting of 2 g tris (hydroxymethyl)aminomethane and 10 ml 1 M sulfuric acid dissolved in water and diluted to 1000 ml (65:35)

All other parameters are the same as described above. A typical chromatogram is given in Figure 3.

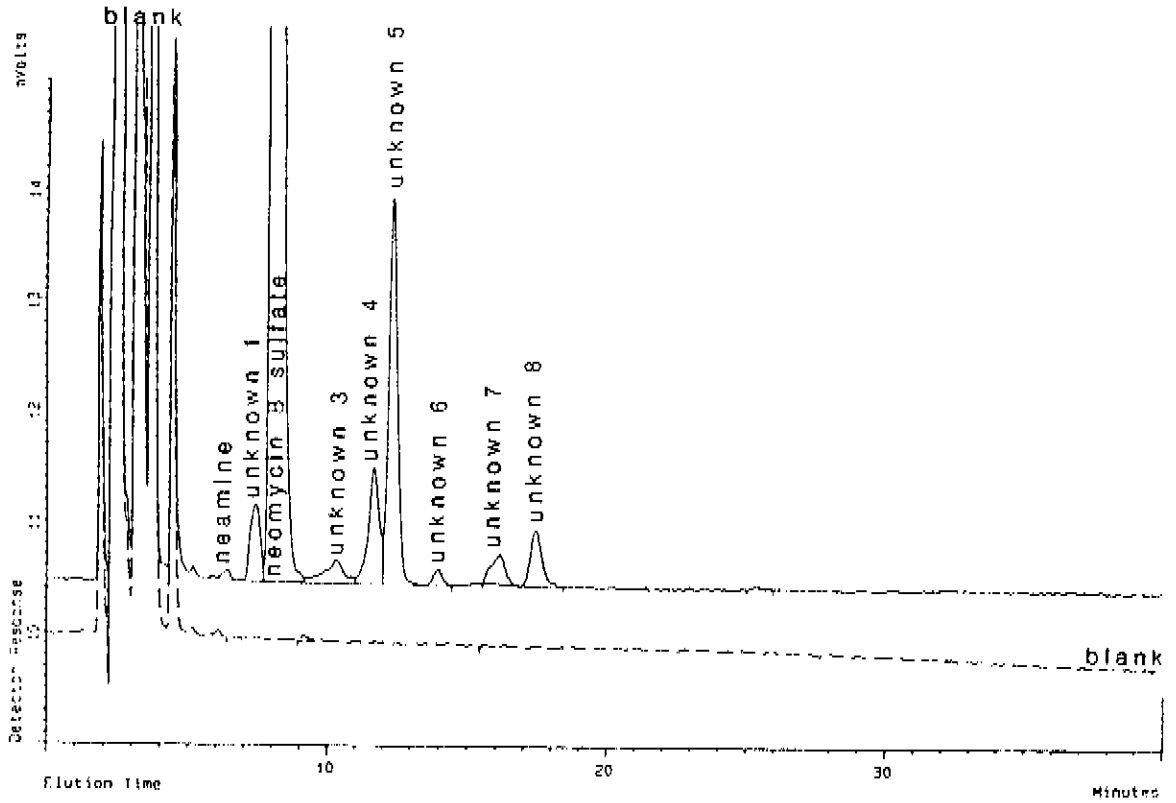


Figure 3. *Chromatogram of neomycin B sulfate Control No 193178 as 2,4-dinitrofluorobenzene derivative monitored at 367 nm. (Eluent 65:35)*

When the results from those two systems are combined eight unknown impurities as well as neamine, neomycin C and the paromomycines were found. The total "apparent" purity was estimated to be about 86.2%. The purity is referred to as "apparent" as we do not have the corresponding impurities as references and thus had no possibility to study their behaviour in the derivatization step.

The total purity for the International Biological 1st Reference Preparation for neomycin B (sulfate) was 87.3%, for the USP reference standard for neomycin sulfate lot K-3 86.5% and for BPCRS framycetin sulfate lot 1507 it was found to be 83.8%.

DATA GIVEN BY THE MANUFACTURER

There is no specific monograph for neomycin B sulfate (framycetin) in the International Pharmacopoeia. Limits from Ph Eur are given.

Description: satisfactory	
Identification tests: satisfactory	
pH: 6.0	(limit 6.0 - 7.0)
Specific optical rotation(on dry substance): +54 °	(limit +52.5 ° – +55.5 °)
Alcohols (in methanol): less than 1g /100 g	(limit < 2%)
Neamine: satisfactory	(limit < 1%)
Neomycin C: 1.5 g/100 g	(limit < 3%)
Loss on drying: 4.8 g/100 g	(limit < 8%)
Sulphated ash: less than 0.1 g/100 g	(limit < 1%)
Sulfates (on dry substance):29.8 g/100 g	(limit 27-31%)
Assay (on dry substance): 676 IU/mg	(limit > 630 IU/mg)

STABILITY

Neomycin B sulfate is hygroscopic. Regular reexaminations of the ICRS will be performed.

CONCLUSION

Neomycin B sulfate, Control No 193178, can be considered suitable as International Chemical Reference Substance for the intended purpose.

APPENDIX 14

SPECTINOMYCIN HYDROCHLORIDE
(SPECTINOMYCIN DIHYDROCHLORIDE PENTAHYDRATE)

Control No 193176

Analytical Report

INTENDED USE

The monograph for Spectinomycin hydrochloride in the International Pharmacopoeia 3rd Ed. Vol 3 requires a reference substance of spectinomycin hydrochloride to be used in the infrared spectrophotometric test for identity and in the gas-chromatographic assay.

MATERIAL

About 100 g of the sample (manufacturers batch no 17160) were received at the WHO Centre in July 1990. The material is being stored in tightly closed containers at + 5 °C, protected from light.

This reference substance has been evaluated in collaboration between the WHO Centre in Stockholm and the National Biological Standards Laboratory, Canberra, Australia. Results reported from NSBL are indicated with an asterisk(*) .

ANALYTICAL DATA

Description: A white crystalline powder.

EVIDENCE OF CHEMICAL STRUCTURE

Infrared spectrum

An infrared spectrum is given in Figure 1 (No W 193176). The spectrum is concordant with the spectra of the USP reference standard (Lot F-1) and the International Biological 1st Reference Preparation (WHO).

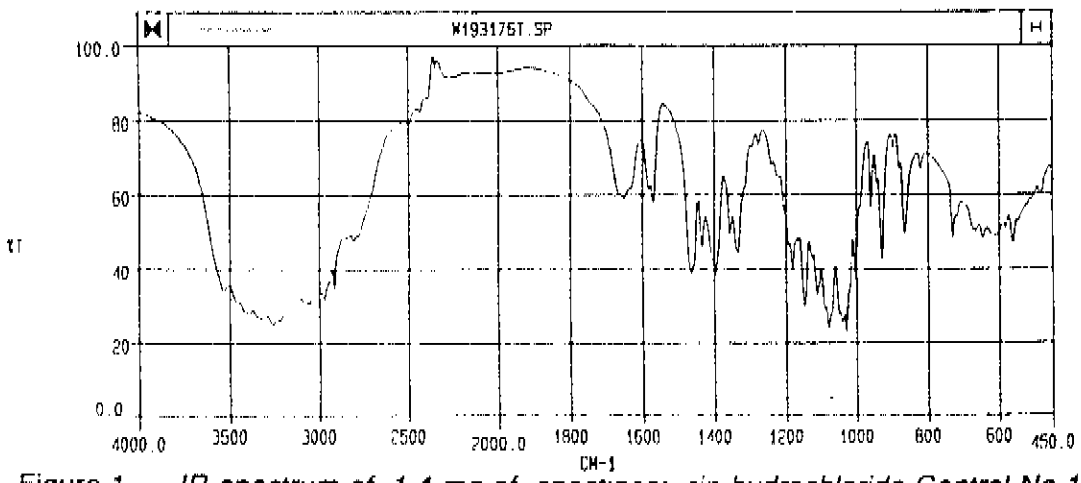


Figure 1. *IR-spectrum of 1.4 mg of spectinomycin hydrochloride Control No 193176 in 300 mg KBr recorded against a KBr disc.*

Instrument: Perkin-Elmer 1600 FTIR.

(*)Infrared spectrum

An infrared spectrum of the material, using the KBr disc technique was recorded on a BioRad FTS-7 Fourier transform Infrared Spectrophotometer. The spectrum was concordant with the spectrum of the International Biological 1st Reference Preparation as well as with a published spectrum from BP 88.

(*)Test for chloride: Positive according to BP 88.

(*)Acidity: pH of a 10% w/v solution was 4.0.

(*)Specific optical rotation: + 19.1 °, determined on a 10% w/v solution.

UV-spectrum

There was no significant absorbance of a 0.5 mg/ml solution in water in the range 200 nm to 500 nm. When a spectrum was taken of a 5mg/ml solution in the mobile phase used for liquid chromatography, a weak maximum was found at 225 nm.

(*)UV-spectrum

There was no significant absorbance of a 20.72 mg/100 ml solution in water in the range 200 - 800 nm.

(*)GC-MS

A HP 5988 A GC/MS system was used. A TMS derivative of spectinomycin hydrochloride was prepared. M+ = 548 mass units of the TMS derivative. There was no evidence of significant amounts of actinamine TMS derivative in the trace of the TMS derivative of spectinomycin.

ASSAY

Liquid chromatographic assay: Taking the proposed ICRS as 100% (n = 10, RSD = 3.4%) the calculated value for the International Biological 1st Reference Preparation was 98.7% and for the USP reference substance 100.9%. The difference between the proposed ICRS and the other two reference materials is not statistically significant at the 95% confidence level using unpaired t-test. The determination was performed with the liquid chromatographic method with electrochemical detection described below under purity.

Microbiological assay: 680 IU/mg "as is" with limits of error 96-104%. The 1 st International Biological Preparation (671 IU/mg "as is") was used as standard.

(*)Microbiological assay: 663 IU/mg "as is" with fiducial limits of error (P = 0.95) of 667 and 659 IU/mg. 812 IU /mg as anhydrous substance with fiducial limits of error (P = 0.95) of 817 and 807 IU/mg. The first International Preparation of spectinomycin hydrochloride (1975) was used as standard.

Gas chromatographic assay: Taking the proposed ICRS as 100% the USP Reference substance Lot F-1 (671 µg/mg) and the International Biological 1st Preparation (671 IU/mg) were estimated to be 95.5% and 98.3% respectively when determined with the gas chromatographic method described in Ph. Int. Due to disturbances in the silanization step caused by the high water content, a double peak was formed. The direct liquid chromatographic method with electrochemical detection and no derivatization step described below is preferred for assay purposes.

(*)Gas chromatographic assay: 98% if the International Biological 1st Reference Preparation (1975) was used as standard. The gas chromatographic method described in USP 85 was used.

Thermogravimetric analysis: When the substance was heated to 169 °C, a loss of 18.1% of weight was observed.

Instrument: Perkin Elmer TGA 7 Thermogravimetric analyzer.
Sample weight: 3 mg
Heating rate: 5 °C/min
Melting point: about 184-194 °C

The corresponding results for USP Lot F-1 was 18.5% and for WHO International Biological 1st Reference Preparation 18.0%.

(*)Water: 18.4% w/w (n = 3, RSD = 0.07%) determined by Karl Fischer titration.

PURITY

(*)Thin-layer chromatography

No secondary spots were detected. The thin-layer chromatographic system described in BP 88, which is the same as in the International Pharmacopoeia, was used. Rf for spectinomycin hydrochloride is 0.3-0.4. This Rf -value corresponds to that of the International Biological 1st Reference Preparation (1975) of spectinomycin dihydrochloride. The degradation product actinamine was shown to be well separated from spectinomycin in this system, with a lower Rf-value than 0.3, and it was not detected in the proposed ICRS.

Thin-layer chromatography

No secondary spots were detected.
The following thin-layer chromatographic system according to the International Pharmacopoeia 3rd Ed. Vol 3 was used.

Thin-layer:	Silica gel 60 F-254 (Merck)
Eluent:	1-propanol:water: glacial acetic acid:pyridine (10:8:1:1)
Sample:	200 and 300 µg of spectinomycin hydrochloride dissolved in water were applied.
Visualization:	Visualization in day-light after spraying with potassium permanganate (25 g/l).

No secondary spots were detected after spraying. An attempt was made to scan the plate at 210 nm before spraying. However the result was unsuccessful, no spots at all were visible.
The detection limit of the system was about 5 µg (1.6%) after spraying.

Rf (spectinomycin hydrochloride) = 0.4

The same results were obtained for the USP reference substance Lot F-1 and the WHO International Biological 1st Reference Preparation.

High performance liquid chromatography

A liquid chromatographic system with electrochemical detection according to Elrod et al. Pharmaceutical Research, Vol.5, No 10, 1988 page 664 was used.

A chromatogram is shown in Figure 2.

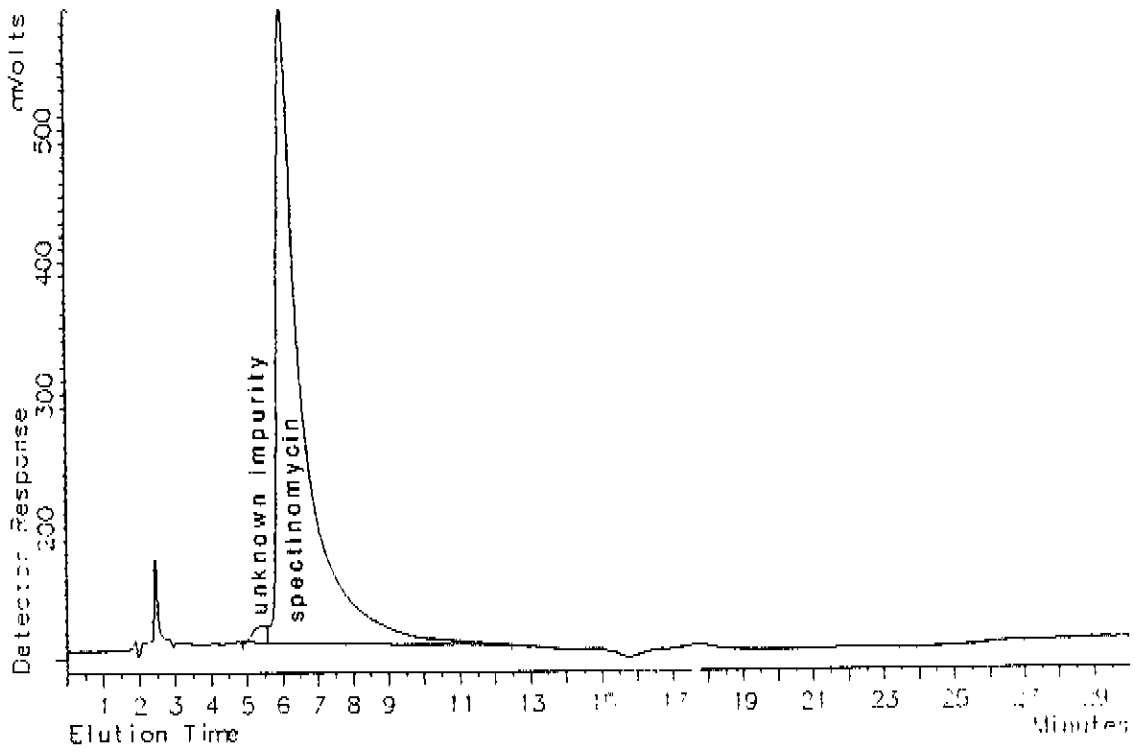


Figure 2. *Chromatogram of spectinomycin hydrochloride Control No 193176 monitored by electrochemical detection.*

The following conditions were used:

Eluent: Acetonitrile: Aqueous buffer containing 0.02 M sodium citrate and 0.0015 M octyl sodium sulfate, pH was adjusted to 6.1 with 70% perchloric acid (11.5 : 88.5)

Column: Brownlee Labs RP -18 OD -5A

Detector: ESA, Coulochem II Guard cell :0.95 V Single porous working electrode:850 mV Background current:10 µA

Pump: Varian 5500 operated at a flow rate of 1ml/min.

Integrator: PeakPro (Beckman)

Sample: 0.02-0.03 mg/ml dissolved in the eluent. A 0.2 mg/ml solution is too concentrated for the use of this detector 20 µl corresponding to 0.4 µg were injected.

As can be seen from figure 2 one possible impurity is observed at about 5.4 minutes. It was estimated to be about 1.5% in the proposed ICRS and in the USP (Lot F-1), and to 1.6% in the International Biological 1st Reference Preparation. However, as no impurity reference substance was available, this figure can only be used as a comparison of the quality between the three substances. It is probably not possible to perform a correct peak area normalisation when working with electrochemical detection, the necessity for impurity reference substances being obvious. The peak at 2.5 minutes originates from the blank.

DATA GIVEN BY THE MANUFACTURER

Spectinomycin hydrochloride = spectinomycin dihydrochloride pentahydrate
Purity: 67.1% "as is" as the anhydrous base determined by GC and micro assay
GC = 67.2% as is (n = 9, RSD = 0.4%)
HPLC = 66.4% as is (n = 9, RSD = 1.6%)
Micro assay: 66.6%
Description: White to pale buff crystalline powder
Identity by GC: Complies
Identity by IR: Complies
Water KF: 18 .2%
Acetone: 0.1%
Hygroscopicity: Slightly hygroscopic (0.3% at 90%RH for 24 hours)

STABILITY

Stability studies were not performed as this substance was not suspected to degrade easily. According to the manufacturer the substance is slightly hygroscopic. Regular reexaminations of the ICRS will be performed.

CONCLUSION

Spectinomycin hydrochloride, Control No 193176, can be considered suitable as International Chemical Reference Substance for the intended purpose. When used in chemical assays the content of spectinomycin hydrochloride ($C_{14}H_{24}N_2O_7$, 2HCl) is taken to be 81.9% on the "as is" basis corresponding to 100% on the dried basis. This corresponds to 67.2% of spectinomycin anhydrous base ($C_{14}H_{24}N_2O_7$). The result from microbiological assay was 680 IU/mg when determined "as is".

APPENDIX 15

VINCRISTINE SULFATE

Control No 193181

Analytical Report

INTENDED USE

The monograph for Vincristine sulfate in the International Pharmacopoeia 3rd Ed. Vol 3 requires a reference substance for vincristine sulfate to be used for the infrared spectrophotometric identity test and in a thin-layer chromatographic test for related substances.

MATERIAL

About 70 x 10 mg of freeze-dried material obtained from the European Pharmacopoeia Commission were received at the WHO Centre in July 1992. The material is being stored in tightly closed containers at - 20 °C, protected from light. After analysis and labelling they will be stored at +5 °C, protected from light.

CAUTION: As vincristine sulfate is a cytotoxic drug it should be handled with care. Avoid contact with the skin and inhalation of airborne particles. Do not open the ampoules for weighing. After releasing the vacuum by piercing the rubber stopper with a hypodermic needle, inject the solvent eg. water or methanol directly through the rubber stopper and dissolve the freeze-dried material in the ampoule and on the stopper while shaking the ampoule with the solvent. Each ampoule contains approximately 9.7 mg of vincristine sulfate.

The lyophilized samples are very static and as such difficult to weigh.

ANALYTICAL DATA

Description: White crystals.

EVIDENCE OF CHEMICAL STRUCTURE

Infrared spectrum

An infrared spectrum is given in Figure 1 (No W 193181 W). The spectrum is concordant with the spectrum of vincristine sulfate no 968 published in Dibbern.

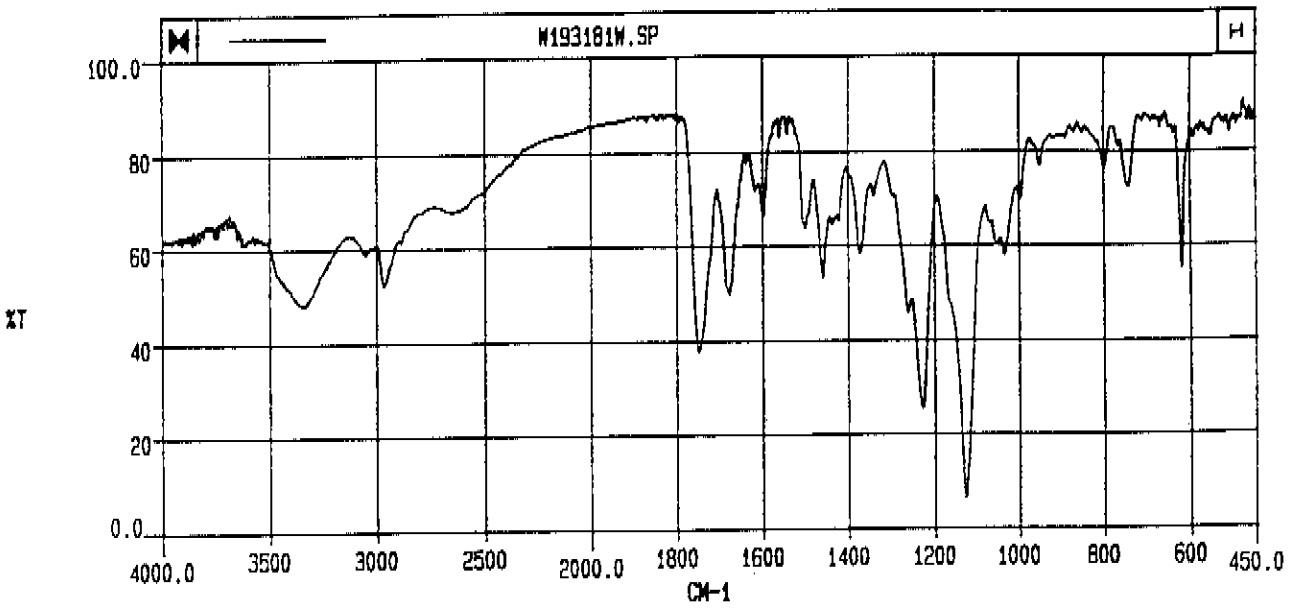


Figure 1. *IR-spectrum of vincristine sulfate Control No 193181. A solution of vincristine sulfate in methanol was dropped onto a KBr disc and dried to a film for five minutes in 105 °C.*
Instrument: Perkin-Elmer 1600 FTIR.

UV-spectrum: A UV-spectrum of a 20 µg/ml solution in methanol is given in Figure 2.

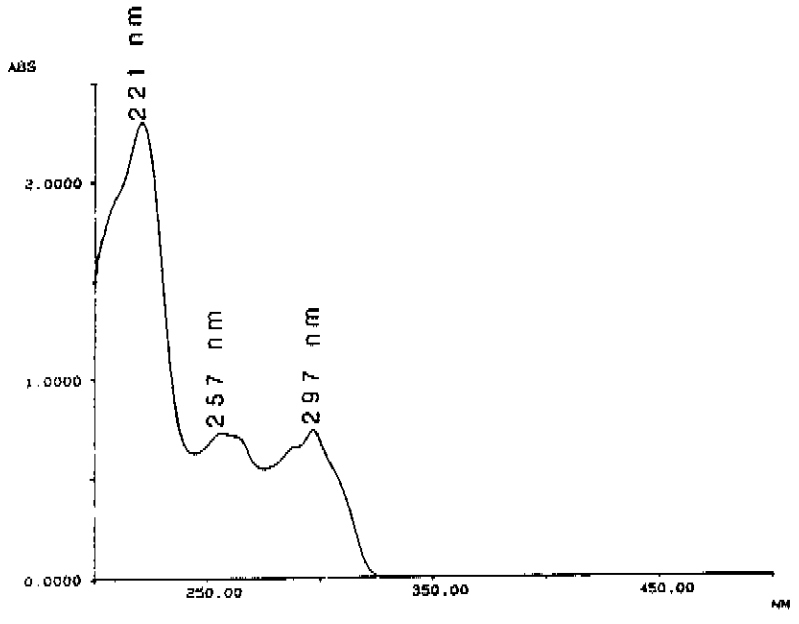


Figure 2. *UV-spectrum of vincristine sulfate Control No 193181 20 µg/ml in methanol.*

HPLC: The ICRS showed the same retention time as the USP reference standard lot L for vincristine sulfate in the chromatographic system described under assay and purity.

ASSAY

Liquid chromatographic assay: 9.3 mg of vincristine sulfate per ampoule (n = 3, RSD = 1.4%).
The bulk substance of vincristine sulfate (540 mg 19.2.90) before freeze-drying was used as standard, which according to thermogravimetric analysis showed a 7.2% loss in weight.

The liquid chromatographic system used is described under purity. The total amount in each ampoule was dissolved in 5.00 ml of 0.9% Na Cl.

Spectrophotometric assay: 9.7 mg of vincristine sulfate per ampoule (n = 6, RSD = 2.1%) determined according to the spectrophotometric assay described in BP 88 and Ph. Int 3rd Ed. Vol 3. According to the Pharmacopoeia the calculations were performed with *A* (1%, 1 cm) = 177. The sample was dissolved in methanol injected directly into the vial and further diluted to 0.02 mg/ml. The higher result obtained with this method could be due to the calculation with a theoretical value for *A* (1%, 1 cm).

Thermogravimetric analysis: When one ampoule of the lyophilized substance was heated to 250 °C a loss of about 8% of weight was observed.The lyophilized samples are very static and difficult to weigh.

Instrument:	Perkin Elmer TGA 7 Thermogravimetric analyzer.
Sample weight:	3 mg
Heating rate:	5 °C /min

PURITY

Thin-layer cromatography

The total amount of impurities was estimated to about 0.3%.
The following thin-layer chromatographic system according to the International Pharmacopoeia 3rd Ed Vol 3 was used.

Thin-layer:	Silica gel 60 F-254 (Merck)
Eluent:	Toluene:chloroform:diethylamine (40:20:3)
Sample:	50 µg and 100 µg of vincristine sulfate were applied. The sample was dissolved in methanol.
Visualization:	Evaluation under UV-light of 254 nm and scanning by densitometry at 297 nm, with a Desaga CD 60 Scanner.

Two secondary spots were detected visually at 254 nm. When evaluated by densitometry at 297 nm two secondary spots were detected. The total amount was estimated to about 0.3% at 297 nm. The detection limit of the system was about 0.1 µg (0.1%) at 297 nm.

Rf (vincristine sulfate) = 0.15

High performance liquid chromatography

About 1.2% of impurities were found. Four unknown impurities were detected at 297 nm.

A chromatogram is shown in Figure 3.

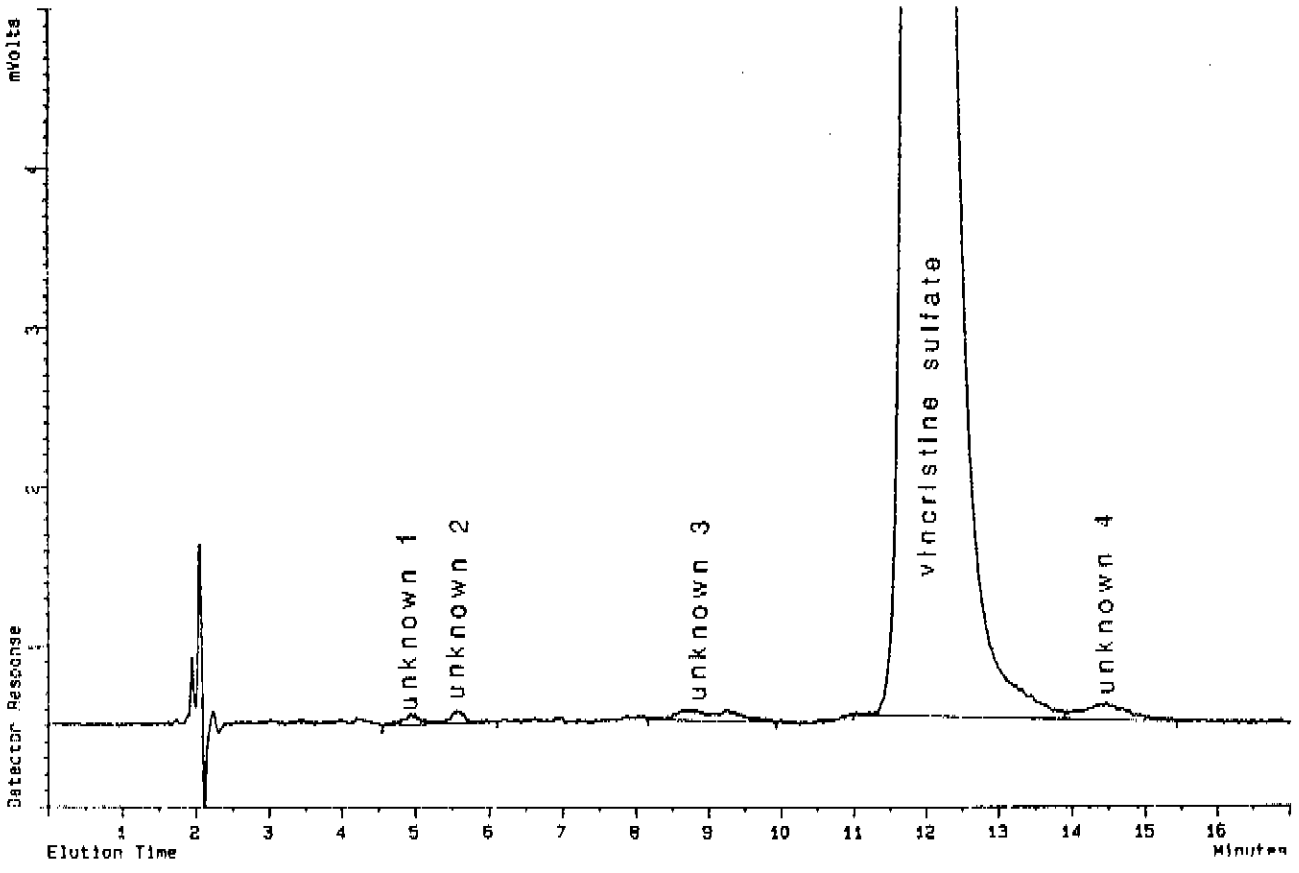


Figure 3. *Chromatogram of vincristine sulfate Control No 193 181 monitored at 297 nm.*

The following conditions were used:

Eluent: Ammonium hydrogenphosphate 0.01 M, pH 4.5:Acetonitrile:Methanol (120:40:40). The eluent also contained 0.01 M sodium heptane sulphonate.

Column: Nucleosil 100 -5 CN

Detector: Schimadzu SPD -6 AV monitored at 297 nm.

Pump: LDC Constrametric III operated at a flow rate of 1.0 ml/min.

Integrator: PeakPro (Beckman)

Sample: 40 µg/ml dissolved in 0.9% NaCl.
25 µl corresponding to 1µg were injected.

A comparison was also made with USP lot L for vincristine sulfate which was shown to contain about 1% impurities, predominantly as unknown 4.

DATA GIVEN BY COLLABORATING LABORATORIES

Ph Eur CRS
Infrared: conforms
HPLC purity: 99.5%
TG: 7.4%

STABILITY

Sability studies were not performed as this substance was not suspected to degrade easily in dry state at +5 °C. However this substance is very hygroscopic and degrades rapidly at room temperature. Regular re-examinations of the ICRS will be performed.

CONCLUSION

Vincristine sulfate, Control No 193181, can be considered suitable as International Chemical Reference Substance for the intended purpose.

* * *